

炎症反応が腫瘍の肝、肺転移形成に及ぼす
影響に関する研究

ほりぐち ひろゆき

堀 口 寛 之

(外科系プライマリー・ケアー学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

目 次

第 1 章	緒言	1 頁
第 2 章	腹腔内感染が悪性腫瘍の肝転移に及ぼす影響に関する検討 －HGF/c-Met カスケードに着目して－	
第 1 節	背景及び目的	4 頁
第 2 節	材料及び方法	5 頁
第 3 節	結果	11 頁
第 4 節	考察	14 頁
第 5 節	小括	16 頁
第 3 章	急性肺傷害及び肺炎が悪性腫瘍の肺転移に及ぼす影響に関する検討	
第 1 節	背景及び目的	18 頁
第 2 節	材料及び方法	19 頁
第 3 節	結果	22 頁
第 4 節	考察	25 頁
第 5 節	小括	27 頁
第 4 章	急性肺傷害及び肺炎が肺での細胞接着分子発現に及ぼす影響に関する 検討	
第 1 節	背景及び目的	28 頁
第 2 節	材料及び方法	29 頁
第 3 節	結果	33 頁
第 4 節	考察	35 頁
第 5 節	小括	37 頁
第 5 章	総括	39 頁
第 6 章	結論	41 頁
	謝辞	42 頁

略語一覽	43 頁
参考文献	45 頁
図・表	51 頁

第 1 章 緒言

日本をはじめとする先進諸国において、悪性新生物は虚血性心疾患などとともに主要な死因の一つである(1)。近年の診断技術の向上や新規治療法の開発により、多くの悪性腫瘍において生存期間の延長が得られてきたものの、その成績は未だ十分とは言い難い。固形がんは悪性新生物の 8 割以上を占めており、それらに対する最も有効な治療法は外科的な完全切除である。一方、生体にとっては外科手術そのものが侵襲であるとともに、術後には縫合不全、腹腔内膿瘍、手術部位感染などの感染性合併症が一定の頻度で発生する。これらは周術期死亡に直結するのみならず、**quality of life** の低下、術後補助療法の開始の遅延、医療費の増大など、患者に多大な負の影響をもたらす。さらに近年、これらの感染性合併症の発症は術後の短期成績に影響を与えるのみならず、長期予後をも悪化させる可能性を示す後方視的検討結果が大腸癌、胃癌、食道癌、非小細胞肺癌、乳癌など多くの癌腫において報告されてきている(2)。実際に当教室の大腸癌、胃癌、食道癌患者について同様の検討を行ったところ、感染性合併症を発症した症例では、発症しなかった症例と比較して長期予後が有意に不良であった(3, 4)(図 1)。当教室ではこれまでに、動物実験において感染性侵襲が悪性腫瘍の増殖を促進することを報告してきたが(5)、そのメカニズムについては十分に解明されていないのが現状である。

悪性腫瘍に対する根治術後の生存に関わる最も重要な因子は転移・再発である。悪性腫瘍の転移・再発形成には、腫瘍細胞の増殖、遊走、接着、浸潤などの複数の過程を伴う(6, 7)。したがって感染性合併症の併発が腫瘍の転移・再発を促進するという事象は、感染性合併症に起因する何らかの因子が、これらの過程のいずれかに影響を与えている可能性を示唆している。感染性合併症を併発した場合には、病原微生物が有する **Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)**の生体への暴露により、炎症性・抗炎症性サイトカイン、ケモカイン等のメディエータが複数産生され、それらのメディエータの複雑な関与により生体反応が惹起される(8)。当教室では *Helicobacter pylori* が有する **lipopolysaccharide (LPS)**が胃癌細胞上に発現する **Toll-like receptor 4** を介して胃癌細胞の増殖を促進することを証明した(9)。感染性合併症が腫瘍細胞の増殖・転移を促進するメカニズムを考察する上では、**PAMPs** による腫瘍細胞への直接的な増殖メカニズムのほか、炎症反応に起因して発現するメディエータによる腫瘍細胞と宿主細胞への影響を考慮する必要がある(10)。さらに悪性腫瘍の転移部位は肝、肺、骨や腹膜など多岐にわたり、癌腫によって転移や再発の様式も異なる。この理由として、腫瘍細胞の臓器親和性が異なることに加えて、その定着や生存を促進する接着分子や増殖因子などの発現が臓器により差異があることが指摘されており、転移臓器毎の詳細な検討が必要とされる(11, 12)。

そこで本研究では、感染性合併症の併発が悪性腫瘍の転移・再発を促進するメカニズムを解明するために、感染性侵襲により亢進する転移臓器側及び腫瘍側の細胞増殖にかかわる因子の解明と、臓器親和特性、特に肝臓、肺における腫瘍増殖のメカニズムについて検討した。

第 2 章 腹腔内感染が悪性腫瘍の肝転移に及ぼす影響に関する検討

—Hepatocyte growth factor (HGF)/c-Met カスケードに着目して—

第 1 節 背景及び目的

腹腔内感染をはじめとする重症感染症では、局所及び全身性に産生されたサイトカインなどのメディエータが複雑に関与し生体反応をコントロールしている(13, 14)。これらのメディエータは、感染生体での炎症反応の賦活化や制御、組織修復に関与し、また、過剰な炎症反応による臓器障害を回避する上で重要な役割を担う。一方、担癌生体では様々なメディエータが直接的あるいは間接的に、癌の増殖や進展に関与していることが知られている(10) (表 1)。すなわち、Interleukin-10 (IL-10)や Transforming growth factor- β (TGF- β)の過剰発現や Interferon- γ (IFN- γ)や Interleukin-12 (IL-12)の産生低下は宿主の腫瘍免疫を低下させて間接的に腫瘍の増殖を促進するものであり(15-18)、Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、Interleukin-18 (IL-18)、Regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES)などのケモカインは腫瘍細胞に発現する受容体を介して直接的に腫瘍増殖に関与するサイトカインとして報告されている(19-21)。

Hepatocyte growth factor (HGF)は主に線維芽細胞などの間葉系細胞から産

生されるサイトカインである。当初、初代培養肝細胞の増殖を強く促進する因子として精製されたサイトカインであるが、後に肝細胞の増殖ばかりでなく、様々な上皮系細胞、内皮細胞、一部の間葉系細胞の増殖も促進することが報告されている(22)。HGF は手術侵襲や sepsis などにおいても産生量が増加することが以前から知られていた(23, 24)。1991 年に Bottaro らによって、HGF の受容体はがん原遺伝子である c-Met であることが証明され、HGF が有する多彩な生物作用は c-Met を介して発揮されることが判明した(22, 25)。

そこで本章では、腹腔内感染モデルにおける HGF 産生状況を検討するとともに、宿主の間葉系細胞等が産生する HGF と腫瘍細胞に発現する c-Met との直接作用に着目して、感染に起因する炎症が HGF/c-Met カスケードの modulation を介して肝転移の成立を促進する可能性を検討することとした。

第 2 節 材料及び方法

本研究における動物実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認(承認番号 10073)を受け、動物実験の適切な実施に向けたガイドラインに基づいて実施した。

(1) 動物と細胞株

① マウス

8~10 週齢の雌性 BALB/c マウス(日本エスエルシー)を使用した。固形餌や水分の摂取は自由とした。

② マウス大腸癌細胞株

マウス大腸癌細胞 Colon-26 を親株とする肺への高転移株(NL17 細胞株; 癌研究会癌化学療法センター藤田直也博士より供与)を用いた。

NL17 細胞株は、10%ウシ胎児血清(FBS)加 RPMI1640 培地中(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)で、37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。

(2) 方法

① 肝転移モデルの作成

NL17 細胞株を Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)に浮遊させ、 1×10^6 個/ml に調整した。ペントバルビタールによる全身麻酔下にマウスの左季肋部の皮膚に約 1cm の切開をおき、皮下を剥離し腹膜を露出させた後、27G 注射針を用いて 1×10^5 個 (100 μ l)の NL17 細胞株を経腹膜的に脾臓に接種した。

② 腹膜炎モデル

腫瘍細胞の脾臓接種後に、盲腸結紮穿刺法(cecal ligation and puncture ; 以下 CLP)により腹膜炎モデルを作成した(CLP 群)。すなわち、全身麻酔下に中腹部正中に約 1cm 開腹し、盲腸根部を 3-0 絹糸で結

紮した後に 23G 針で盲腸を 1 回貫通させた。補液として閉腹時に 1ml の生理食塩水を腹腔内投与した。飲用水には抗生物質テトラサイクリン(和光純薬工業)を溶解し、3 日目まで投与した。処置後は、水分、食餌摂取ともに自由とした。本腹膜炎モデルの 14 日間生存率は 78%であった。なお、開腹後に盲腸の結紮及び穿刺を行わず閉腹したものを Sham 群、開腹処置を行わなかったものを Control 群とした。

③ 肝転移の評価

CLP 群、Sham 群での肝転移状況を評価するため、腫瘍細胞の脾臓接種後 7 日目と 14 日目に、ペントバルビタールによる麻酔後、経心臓採血による脱血により犠死させ肝組織を採取した。肝組織は、肝重量を測定した後に、10%ホルムアルデヒド中に 48 時間固定し、パラフィン包埋を行った。肝転移の評価として、肝重量、及び肝臓の最大断面における腫瘍の占拠面積比を測定した。占拠面積比は、薄切スライド標本(4 μ m)を脱パラフィン、親水化し、ヘマトキシリン・エオジン染色(以下、HE 染色)により得られた組織像を紙面にトレースし、断面における腫瘍が占める割合を紙の重量比により算出した。

④ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法

血清中の HGF 量は DuoSet® ELISA Mouse HGF (R&D Systems,

Inc., Minneapolis, MN, USA)を用い、キットマニュアルに基づいて測定した。

⑤ Flow cytometry

NL17 細胞株を 5×10^5 個/100 μ l に調整し、PE 標識抗マウス c-Met 抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で 4°C、15 分間のインキュベーションを行った。Isotype control として PE 標識抗マウス IgG1, kappa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いた。Flow cytometry 測定と解析には Cytomics FC500 (Beckman Coulter)を使用した。

⑥ Recombinant mouse HGF 腹腔内投与が肝転移に与える影響

NL17 細胞株の脾臓接種後 1 日目に recombinant mouse HGF (rmHGF; R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を 2 μ g/100 μ l/body の量で腹腔内投与し、14 日目に犠死させ肝転移の形成状況を肝重量で評価した。なお、同量の生理食塩水を投与したマウスを Control 群とした。

⑦ c-Met ノックダウン (c-Met KD) NL17 細胞株の作成

Shinomiya らの方法(26)に準じ、ウイルスベクター法による RNA interference による c-Met ノックダウン細胞を作成した。すなわち、

U6 プロモーター下に c-Met に対する siRNA を組み込んだアデノウイルス (AdMetsiRNA^{178M}) を NL17 細胞株に対して 100 MOI (multiplicity of infection: 感染強度) で感染させ、37°C、5%CO₂ の条件下で 72 時間インキュベートを行った。c-Met ノックダウンの確認はウエスタンブロット法にて c-Met 発現量を測定して評価した。なお、対照として非特異的な siRNA 配列 (Firefly luciferase) を組み込んだアデノウイルス (AdGL-2) を同様の条件で感染させた NL17 細胞株 (AdGL-2 NL17 細胞株) を用いた。

⑧ 蛋白抽出

培養細胞が組織培養用ディッシュに生着した状態で培養液を取り除き、Phosphate Buffered Saline (PBS) にて洗浄した後に、プロテアーゼ阻害剤 Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を加えた RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を滴下し、氷上で 5 分間放置することで細胞溶解液を作成した。細胞溶解液は 15,000rpm, 15 分間遠心し、上清を蛋白検体として回収した。得られた蛋白検体は Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により定量した後に、実験に使用した。

⑨ ウェスタンブロット法

蛋白検体を 2-Mercaptoethanol を添加した 4×Laemmli サンプルバッファー(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)と混和し、98℃、5 分間で加熱処理を行った後に 10% ミニプロティアン® TGX™ プレキャストゲル(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)の各ウェルにローディングし、100V、85 分間の電気泳動を行った。電気泳動終了後は、転写装置により 100V、90 分間の通電を行い、蛋白を SDS-ポリアクリルアミドゲルからポリビニリデンディフルオライド (PVDF 膜) (GE healthcare, UK)へ転写を行った。その後、PVDF 膜を PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO 大阪)にてブロッキングを行った後に、Can Get Signal Solution 1(TOYOBO 大阪)で 1,000 倍に希釈した 1 次抗体 (Met 抗体; B-2: sc8057, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)に一晩、4℃で浸した。1 次抗体で処理後の PVDF 膜は洗浄の後、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO 大阪)で 100,000 倍希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) で標識された抗マウス IgG を 2 次抗体として用い、常温で 1 時間インキュベーションを行った。バンドの検出には Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare, UK) を使用し、Image

Quant LAS4000(富士フィルム)で撮影した。

⑩ c-Met KD NL17 細胞株接種モデル

腹膜炎モデルマウスに c-Met KD NL17 細胞株、AdGL-2 NL17 細胞株、もしくは対照 NL17 (アデノウイルス未感染)細胞株を各 1×10^5 個経腹膜的に脾臓に接種し、腫瘍肝転移モデルを作成した。14 日目の肝転移形成状況を肝重量で評価した。

⑪ 統計学的解析

得られたデータは JMP Pro 13.1.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC)を用いて解析した。平均値で求められる数値には標準誤差を付記し、2 群間の比較には Welch の t 検定もしくは Mann-Whitney の U 検定を、多群間の比較に関しては one-way ANOVA 及び post-hoc test として Tukey の検定を用いた。いずれの検定においても $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。

第 3 節 結果

(1) 腹膜炎がマウスの肝転移形成に及ぼす影響

腫瘍細胞の脾臓接種後 7 日目に CLP 群で肉眼的肝転移結節が確認されたが、Control 群及び Sham 群では観察されなかった。14 日目には Control 群

及び Sham 群でも肉眼的結節が複数個確認されたが、CLP 群において肉眼的結節数は著明に増加した。14 日目における肝重量を評価したところ(各群 n=20)、CLP 群は Control 群や Sham 群と比較して有意に肝重量が増加していた(Control 群 : $1.28 \pm 0.04\text{g}$, Sham 群 : $1.53 \pm 0.13\text{g}$, CLP 群 : $2.56 \pm 0.18\text{g}$, $p < 0.001$)(図 2)。また、肝の最大断面における腫瘍面積比においても CLP 群では Control 群、及び Sham 群と比較して有意に高値を示した (Control 群 : $9.8 \pm 4.5\%$, Sham 群 : $13.9 \pm 4.9\%$, CLP 群 : $44.8 \pm 18.1\%$, $p < 0.001$)。

(2) CLP モデルにおける HGF の産生

CLP 群の血清 mHGF 値は、モデル作成後 1 日目では Sham 群と比較して有意に高値を示した (CLP 群 : $2512 \pm 400\text{ pg/ml}$, Sham 群 : $551 \pm 76\text{ pg/ml}$, 各群 n=6) (図 3)。一方、7 日目では mHGF 値は依然として高値を示していたが、両群間に差は認められなかった (CLP 群 : $1569 \pm 368\text{ pg/ml}$, Sham 群 : $1549 \pm 502\text{ pg/ml}$)。

(3) NL17 細胞株における c-Met の発現

NL17 細胞株における c-Met の発現をフローサイトメトリーで検討した結果、NL17 細胞株の約 85%に c-Met の発現を認めた (図 4)。

(4) rmHGF 投与が肝転移形成に及ぼす影響

腫瘍細胞の脾臓接種後 1 日目に rmHGF を腹腔内投与した群は、生理食塩水を投与した Control 群と比較して、14 日目での肝重量が有意に高値を示した(rmHGF 投与群 : $1.5 \pm 0.4\text{g}$, Control 群 : $1.1 \pm 0.1\text{g}$, $p < 0.01$, 各群 $n=10$)(図 5A)。採取した肝の肉眼所見でも、rmHGF 投与群は Control 群と比較して肝転移形成が促進していることが確認できた(図 5B)。

(5) c-Met KD NL17 細胞株の作成

AdMetsiRNA^{178M} 感染 NL17 細胞株及び AdGL-2 感染 NL17 細胞株から蛋白を抽出し、ウエスタンブロット法にて c-Met の発現を検討したところ、AdGL-2 感染 NL17 細胞株ではいかなる感染強度においても c-Met の発現抑制を認めなかったが、Ad Met siRNA^{178M} 感染 NL17 細胞株では感染強度依存性に c-Met の発現が抑制された(図 6)。

(6) c-Met KD NL17 細胞株を用いた CLP モデルマウスにおける肝転移形成状況

100 MOI の割合で AdMetsiRNA^{178M} を感染させた NL17 細胞株(c-Met KD NL17 細胞株)、AdGL-2 NL17 細胞株、対照 NL17 (アデノウイルス未感染) 細胞株を CLP モデルマウスの脾臓に 1×10^5 個/個体で接種し、14 日目の肝転移形成状況を検討した。c-Met KD NL17 細胞株を接種した群は AdGL-2 NL17 細胞株及び対照 NL17 (アデノウイルス未感染) 細胞株を接

種した群と比較して、肝重量が有意に低値で(対照 NL17 (アデノウイルス未感染)細胞株群 : 3.12 ± 0.25 g, Ad GL-2 NL17 細胞株群 : 3.19 ± 0.11 g, c-Met KD NL17 細胞株群 : 1.80 ± 0.23 g, $p < 0.001$, 各群 $n=6$)(図 7A)、肉眼的結節数も少数であった(図 7B)。

第 4 節 考察

本章では、腹腔内感染による悪性腫瘍の肝転移促進のメカニズムについて、HGF/c-Met カスケードに着目して検討した。がん原遺伝子である c-Met は受容体型チロシンキナーゼで、HGF を唯一のリガンドとしてシグナルを細胞内に伝える機能を有する(25)。c-Met は、腫瘍細胞の分裂・増殖に関わるほか、原発巣において細胞間接着を減弱させ腫瘍細胞の浸潤・転移能を獲得する過程にも深く関わる事が知られている(27, 28) (図 8)。当教室では食道癌術後や sepsis 患者では血清 HGF が高値となることを報告し、特に sepsis 患者では入院時の CRP 値と HGF 値が強い正の相関を示すことを報告している(23, 29) (図 9)。そこで我々は、重症感染症によって増加した血清 HGF が、腫瘍細胞に発現する c-Met を介して腫瘍増殖を促進するものと仮説を立て、本実験を行った。その結果、CLP モデルは Sham 群と比較して血清 HGF 濃度が有意に上昇した。そこで、マウスに rmHGF を投与することで CLP 群と同様に肝転移が促進されるかどうか検討

したところ、仮説通り肝転移促進に働くことが判明した。また、siRNA 法により c-Met をノックダウンさせた NL17 細胞株を作成し、高 HGF 環境にある CLP マウスにおいて肝転移が抑制されるか否かを検討した。その結果、c-Met の発現が低下している c-Met KD 細胞を用いたマウスでは、対照(c-Met 発現正常)の腫瘍細胞を用いた場合と比較して、14 日目の肝転移が抑制された。すなわち、感染個体での肝転移促進の機序の一つとして HGF/c-Met シグナル伝達経路が重要な役割を担うことが示唆された。

Gao ら(30)は大腸癌細胞の c-Met 発現が大腸癌のリンパ節転移や病期進行に関連していることや、c-Met 阻害薬の使用によって細胞死や細胞増殖が抑制されることを *In vitro*, *In vivo* の実験で示し、腫瘍細胞の細胞増殖における c-Met 発現の意義について報告した。また、Toiyama ら(31)は、recombinant HGF を添加することで胃癌細胞株の上皮間葉転換が促進され、また、細胞の増殖、遊走、浸潤も促進されることを示し、c-Met の阻害により、それらが抑制されることを報告した。これらの既存の報告から、腫瘍細胞における c-Met の発現は腫瘍増殖や転移形成に大きく関与しており、c-Met 阻害薬が腫瘍細胞の増殖や転移の抑制にかかわる新規薬剤としてとして注目されてきた(32)。一方で、sorafenib 治療歴を有する c-Met 高発現の切除不能肝細胞癌を対象とした c-Met に対する分子標的薬(tivantinib)の第 III 相試験では、主要評価項目である全生存期間の改

善を示すことができなかつた(33)。動物実験や *in vitro* で抗腫瘍効果を示したそのほかの c-Met 阻害薬においても、tivantinib 同様、臨床試験ではその有効性を示すことはできなかつた(34)。この原因として、腫瘍における c-Met 発現量を正確に評価できないこと、また、c-Met 高発現症例を選別できる biomarker が欠如し、c-Met 阻害薬の responder を正確に選別できないことなどがあげられている(33)。本検討では c-Met 発現株である NL17 細胞株において、CLP モデルや rmHGF の投与により肝転移が促進された。この結果は HGF/c-Met カスケードを介した腫瘍の転移形成には腫瘍細胞の c-Met の発現の多寡だけでなく、血清中 HGF が高値の症例や、術後感染性合併症を来した症例などの宿主側の因子が関わっていることを示しており、c-Met 阻害薬の responder を予測する上で腫瘍細胞の c-Met 発現の多寡だけでなく、血中 HGF 値や、術後感染性合併症の有無といった宿主側の因子が重要である可能性があり、c-Met 阻害薬の臨床効果を評価するには、血中 HGF 値や術後感染性合併症の影響を検討するために、それらのパラメーターで群分けした subgroup の解析が必要であろう。

第 5 節 小括

c-Met 発現株である NL17 細胞株を脾臓に接種した実験系において、rmHGF 投与により肝転移が促進された。また、c-Met KD NL17 細胞株を用いた場合に

は、CLP モデルにおける肝転移が抑制されたことから、CLP による肝転移促進のメカニズムの一つとして、HGF/c-Met カスケードが重要であることが示唆された。

第 3 章 急性肺傷害及び肺炎が悪性腫瘍の肺転移に及ぼす影響に関する検討

第 1 節 背景及び目的

消化器癌手術において、縫合不全や遺残膿瘍などの手術部位感染以外に、尿路感染、肺炎などの遠隔部位感染も頻度の高い合併症である(35, 36)。特に肺炎は消化器癌術後に最も頻度の高い合併症であり、その原因として術後の疼痛、長期臥床による無気肺、喀痰排出能の低下などがあげられている。当教室では、食道癌術後の呼吸器合併症を併発した患者において、肺炎の臨床症状を呈する前の術後早期から血中及び胸水中 IL-6 値が高値であることを報告していることから(36)、手術侵襲による局所のサイトカイン産生がその後の全身性の感染性合併症の併発に関与していることが推察される。しかしながら、術後肺炎をはじめとする局所の炎症反応と腫瘍の転移能との関連については、十分な検討がなされていない。

そこで本章では、腫瘍細胞の尾静脈注射による肺転移モデルにおいて、転移部位での炎症反応が転移巣形成にいかなる影響を及ぼすのかを明らかにするために、LPS の気管内投与による急性肺傷害モデル(Acute Lung Injury: ALI)及び *Pseudomonas aeruginosa* 生菌の気管内投与による肺炎モデル(*Pseudomonas Pneumonia*: PP)を作成し、肺での感染性侵襲が腫瘍の発育、進展に与える影響

と HGF/c-Met カスケードの関連について検討した。

第 2 節 材料及び方法

本研究における動物実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認(承認番号 15010)を受け、動物実験の適切な実施に向けたガイドラインに基づいて実施した。

(1) 動物と細胞株

第 2 章第 2 節と同様に動物は 8~10 週齢の雌性 BALB/c マウスを、腫瘍細胞株はマウス大腸癌細胞株 (NL17 細胞株) を用いた。

(2) 方法

① 肺転移モデルの作成

NL17 細胞株を Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) に浮遊し、 5×10^6 個/ml に調整した。塩酸ケタミン、塩酸キシラジンによる全身麻酔下に、BALB/c マウス尾静脈内に 29G 注射針を用いて NL17 細胞株を 5×10^5 個(100 μ l)接種した。

② Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法

血清及び肺胞洗浄液(Bronchoalveolar Lavage Fluid: BALF)中の mIL-6、mIL-10、mTNF- α については、BD OptEIA™ ELISA Set (Becton,

Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)を用いて計測した。

また、mHGF は DuoSet® ELISA Mouse HGF (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)を用いマニュアルに従って測定した。

③ 急性肺傷害モデル及び細菌性肺炎モデルの作成

BALB/c マウスに腫瘍接種後、50µl PBS で調整した LPS (from *Escherichia coli* O111:B4; Sigma, St Louis, MO, USA) 1mg/kg を気管内投与し急性肺障害モデル(ALI)を作成した。同様に腫瘍接種後に 50µl PBS で調整した *Pseudomonas aeruginosa* の生菌(1.5×10^6 CFU/個体)を気管内投与し、肺炎モデルマウス(PP)を作成した。なお、PBS 50µl を気管内投与したマウスを Sham とした。これらの処置後は、水分、食事ともに自由摂取とした。本モデルにおける処置後 14 日間の生存率は 100%であり、処置後 14 日目における肺重量についてはモデル間で差は認めなかった。

④ 肺腫瘍形成の評価

各群における肺腫瘍形成の評価のため、NL17 細胞株の静脈注射後 14 日目に、塩酸ケタミン、塩酸キシラジンによる全身麻酔下に、経心臓採血による脱血で犠死させ、肺組織を採取し肺重量を測定した。

⑤ 細胞増殖試験

rmHGF が NL17 細胞株の増殖に及ぼす影響を検討するため、NL17 細胞株を rmHGF (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) 5ng/ml 及び 50ng/ml 濃度下で 48 時間まで培養を行った。rmHGF 添加前 (0 時間)、添加後 24 時間、添加後 48 時間に、Cell counting kit 8 (同仁化学研究所、熊本)を用いて、マニュアルに基づき細胞増殖について計測した。

⑥ rmHGF 投与による肺腫瘍形成への影響についての検討

NL17 細胞株 5×10^5 個/個体を尾静脈から接種し、翌日 rmHGF (5 μ g/200 μ l/個体)を腹腔内投与した。NL17 細胞株静脈注射後 10 日目に肺腫瘍形成状況を肺重量を見ることにより評価した。

⑦ c-Met ノックダウン (c-Met KD) NL17 細胞株の作成

第 2 章、第 2 節に準じ、アデノウイルスベクターを用いた RNA interference により c-Met ノックダウン細胞を作成した。c-Met ノックダウンの確認は、ウエスタンブロットで c-Met 発現量を測定することにより評価した。なお、対照として非特異的な siRNA 配列 (Firefly luciferase)を組み込んだアデノウイルス (AdGL-2)を同様の条件で感染させた NL17 細胞株を用いた(AdGL-2 NL17 細胞株)。

⑧ 蛋白抽出法

第 2 章、第 2 節に準じて蛋白抽出を行った。

⑨ ウェスタンブロット法

第2章、第2節に準じて実験を行った。

⑩ 急性肺傷害モデルマウスへの c-Met KD NL17 細胞株接種

急性肺傷害モデルマウスに c-Met KD NL17 細胞株、AdGL-2 NL17 細胞株、もしくは対照 NL17 (アデノウイルス未感染)細胞株(各 5×10^5 個/100 μ l)を尾静脈から注射し、14日目の肺腫瘍形成状況を肺重量で評価した。

⑪ 統計学的解析

得られたデータは JMP Pro 13.1.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC)を用いて解析した。平均値で求められる数値には標準誤差を付記し、2群間の比較には Welch の t 検定もしくは Mann-Whitney の U 検定を、多群間の比較に関しては one-way ANOVA 及び post-hoc test として Tukey の検定を用いた。いずれの検定においても $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。

第3節 結果

(1) 急性肺傷害モデル及び肺炎モデルにおける局所のサイトカイン産生に関する検討

LPS の気管内投与による急性肺傷害モデル(ALI)と、*Pseudomonas aeruginosa* の生菌投与による肺炎モデル(PP)での局所性・全身性の炎症反応を検討するために、血清及び BALF 中のサイトカイン濃度を ELISA 法で測定し、Sham 群と比較した。

血清中の IL-6 値は、ALI 群、PP 群ともに Sham 群と比較して 1 日目で有意に高値を示したが(Sham 群 : 58.4 ± 2.0 pg/ml, ALI 群 : 77.1 ± 2.5 pg/ml, PP 群 : 246.0 ± 70.0 pg/ml, $p < 0.01$)、3 日目以降では Sham 群と統計学的な差は認めなかった (図 10)。血清中 IL-10 値も、同様に 1 日目において ALI 群、PP 群ともに Sham 群と比較して有意に高値を示したが(Sham 群 : 2.7 ± 2.5 pg/ml, ALI 群 : 38.2 ± 9.0 pg/ml, PP 群 : 78.6 ± 21.3 pg/ml, $p < 0.01$)、3 日目以降は群間に差は認めなかった。

BALF 中の IL-6 値は、ALI 群、PP 群で Sham 群と比較して 1 日目で有意に高値を示したが(Sham 群 : 194 ± 44 pg/ml, ALI 群 : 1809 ± 299 pg/ml, PP 群 : 3320 ± 448 pg/ml, $p < 0.01$)、3 日目以降では Sham 群と統計学的な差は認めなかった。BALF 中の TNF- α 値は、1 日目において ALI 群、PP 群が Sham 群と比較して有意に上昇したが(Sham 群 : 26 ± 6 pg/ml, ALI 群 : 771 ± 72 pg/ml, PP 群 : 836 ± 26 pg/ml, $p < 0.01$)、3 日目以降では 3 群とも 1 日目と比較して著明に低下した(図 10)。

一方、血清中、BALF 中の mHGF 濃度の測定において、血清中 mHGF は全ての群において検出感度以下の値を示したが、BALF 中の mHGF 値は 1 日目(Sham 群 : 941±113 pg/ml, ALI 群 : 1759±136 pg/ml, PP 群 : 2460±122 pg/ml, $p<0.01$)、3 日目において ALI 群、PP 群ともに Sham 群と比較して有意に高値であり(Sham 群 : 560±57 pg/ml, ALI 群 : 1578±272 pg/ml, PP 群 : 2305±169 pg/ml, $p<0.05$)、ALI 群では 7 日目においても Sham 群と比較して有意に高値であった(Sham 群 : 406±40 pg/ml, ALI 群 : 688±66 pg/ml, PP 群 : 547±41 pg/ml, $p<0.05$, 各群 $n=5-7$) (図 11)。

(2) 急性肺傷害及び肺炎が肺転移形成に及ぼす影響に関する検討

NL17 細胞株の尾静脈注射後 14 日目の肺重量は、ALI 群、PP 群ともに、Sham 群と比較して有意に高値であった(Sham 群 : 0.89±0.07 g, ALI 群 : 1.21±0.04 g, PP 群 : 1.11±0.04 g, $p<0.05$, 各群 $n=5$) (図 12)。

(3) rmHGF 投与による腫瘍細胞の増殖能への影響に関する検討 (*in vitro*)

NL17 細胞株に各濃度の rmHGF (5ng/ml、50ng/ml)を添加し、腫瘍細胞増殖能の変化について検討した。その結果、培養 48 時間後の細胞増殖は rmHGF 濃度依存的に亢進していることが示された(各吸光度 : Control 群 : 2.19±0.12, rmHGF 5ng/ml 群 : 2.40±0.10, rmHGF 50ng/ml 群 : 2.49±0.14, $p<0.01$)(表 2)。

(4) rmHGF 投与による肺腫瘍形成への影響に関する検討 (*in vivo*)

NL17 細胞株の尾静脈注射後 1 日目に rmHGF(5 μ g/body)を腹腔内投与し、rmHGF 投与の肺転移に及ぼす影響について *in vivo* で検討した。しかしながら、PBS を腹腔内投与した Control 群との比較において、腫瘍細胞注射後 10 日目の肺重量は差を認められなかった(rmHGF 投与群:0.32 \pm 0.02mg, Control 群 : 0.34 \pm 0.05mg, 各群 n=5)(図 13)。

(5) 急性肺傷害モデルマウスにおける肺腫瘍形成における c-Met 発現の関与についての検討

c-Met KD NL17 細胞株、AdGL-2 NL17 細胞株、対照 NL17(アデノウイルス未感染)細胞株を尾静脈から注射し、LPS による急性肺傷害モデルを作成し、14 日目の肺重量を計測したところ、3 群間に明らかな差を認めなかった (対照 NL17(アデノウイルス未感染)細胞株群 vs. AdGL-2 NL17 細胞群 vs. c-Met KD NL17 細胞株群 : 1.37 \pm 0.04 g vs. 1.16 \pm 0.02 g vs. 1.35 \pm 0.09 g, 各群 n=5) (図 14)。

第 4 節 考察

本章では、LPS の気管内投与による急性肺傷害モデル(ALI)と *Pseudomonas aeruginosa* 生菌の気管内投与による肺炎モデル(PP)を作成し、これらの操作が

肺転移形成に影響を与えるかどうかについて検討した。その結果、転移部位である肺での炎症が惹起された ALI 群、PP 群では Sham 群と比較して有意に肺転移が促進されることが示された。腫瘍転移促進的に働く肺の炎症病態を明らかにするために、血清中、BALF 中における炎症性・抗炎症サイトカイン値を測定したところ、ALI 群、PP 群ともに、血清中、BALF 中の両方で、炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカインの上昇を認め、ALI、PP が肺の炎症モデルとして妥当であると考えられた。

BALF 中の HGF に関しては ALI 群、PP 群は Sham 群と比較して有意に高値であったが、血清中 HGF 濃度はいずれの群においても測定感度以下であった。すなわち、今回用いた急性肺傷害、肺炎モデルでは、肺局所の HGF 産生を惹起させたものの、腹腔内感染モデルのような血清中の HGF 濃度上昇は伴わないことが示された。急性肺傷害、肺炎モデルでは肺局所の HGF が高値であったことから、肺に到達した腫瘍細胞に対して HGF/c-Met カスケードが活性化される可能性がうかがわれた。しかしながら、rmHGF の腹腔内投与による血中の HGF の上昇では肺転移形成が促進されないこと、NL17 細胞株の c-Met KD によっても肺転移の形成状況に変化が見られないことから、第 2 章で示した腹腔内感染モデルにおける肝転移促進メカニズムとは異なる作用機序によることが考えられた。

HGF は、急性肺傷害や肺炎時における肺胞上皮のバリア機能維持や、肺胞上皮細胞傷害に対して肺胞上皮細胞の増殖を亢進させることでその修復を促進させるなど、肺傷害に対して保護的な役割を持つことが報告されている(37, 38)。また、肺炎患者では健常人と比較し血清中 HGF 濃度が有意に上昇して CRP と正の相関を示すことや、症状の軽快とともにその値が減少することが知られている(39)。一方で、マウスにおける急性肺傷害モデルや肺炎モデルにおいては、BALF 中での HGF 上昇は報告されているものの(40)、血中の HGF 上昇を示した報告はなく、本研究においても同様の結果であった。既存の報告と本研究の結果から、ヒトとマウスの種の違いや、腹膜炎モデルと肺炎モデルでの侵襲の違いにより HGF の産生状況が異なることが推察された。

第 5 節 小括

本検討では、肺での炎症の惹起が肺転移を促進することが示された。しかし、rmHGF の腹腔内投与による肺腫瘍形成の促進は認められず、腫瘍細胞の c-Met の発現の有無によっても肺転移の形成に差はなかった。以上から、ALI や PP の感染性侵襲下の肺における腫瘍形成の促進については、肝転移形成促進に働いた(第 2 章) HGF/c-Met カスケードの関与は小さいと考えられた。

第 4 章 急性肺傷害及び肺炎が肺での細胞接着分子の発現に及ぼす影響に関する検討

第 1 節 背景及び目的

第 3 章において、肺での炎症の惹起が肺転移形成に促進的に働くことを明らかにしたが、そのメカニズムとして、第 2 章で示したような HGF/c-Met カスケードの直接的な関与は証明されなかった。そこで本章では、肺での炎症惹起と肺転移促進に関するメカニズムを解明するために、腫瘍細胞の転移に重要な役割を果たす細胞接着分子、特に腫瘍の転移形成と生体の炎症反応の両者に深く関与する免疫グロブリンスーパーファミリー及びインテグリン、E-selectin などの発現に着目して検討を行った。

免疫グロブリンスーパーファミリーの一部の分子、インテグリン、セレクチンなどは細胞-基質間や細胞相互間の接着に関わる細胞接着分子であり、主な機能として、免疫担当細胞と血管内皮細胞や細胞外基質との細胞接着及び細胞接着により惹起される生体の免疫応答、炎症反応に重要な役割を果たすことが報告されている(41)。また、これらの細胞接着分子は一部の腫瘍細胞にも発現しており、細胞接着のみならず腫瘍細胞の増殖、遊走、浸潤に関与し、腫瘍細胞の転移形成に寄与していると報告されている(42, 43)。しかし、担癌生体における感

染性侵襲時の腫瘍増殖、進展への関与については未だ十分には明らかになっていない。

本章では、感染などの生体侵襲が転移臓器と腫瘍細胞上の細胞接着分子の発現に及ぼす影響並びに、その変化が腫瘍の進展に及ぼす影響を明らかにするため、LPS 刺激後の腫瘍細胞における免疫グロブリンスーパーファミリーやインテグリンなどの接着分子の発現の変化について検討を行った。

第 2 節 材料及び方法

本研究における動物実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認(承認番号 15010)を受け、動物実験の適切な実施に向けたガイドラインに基づいて実施した。

(1) 動物と細胞株

第 2 章第 2 節と同様に動物は 8~10 週齢の雌性 BALB/c マウスを、腫瘍細胞株はマウス大腸癌細胞株(NL17 細胞株)を用いた。

(2) 方法

① LPS 刺激が NL17 細胞株上の接着分子発現に及ぼす影響 (*in vitro*)

第 2 章、第 2 節に準じて、による NL17 細胞株を LPS で刺激(最終濃度 100ng/ml)し、細胞膜上の各種接着分子の発現について Flow

Cytometry を用いて検討した。解析に際しては以下の抗マウス抗体を用いた：PE 標識 CD29 ($\beta 1$ integrin), FITC 標識 CD18 ($\beta 2$ integrin), PE 標識 CD61 ($\beta 3$ integrin), PE 標識 CD104 ($\beta 4$ integrin), PE 標識 $\beta 5$ integrin, PE 標識 CD49b ($\alpha 2$ integrin), PE 標識 CD49d ($\alpha 4$ integrin), FITC 標識 CD49e ($\alpha 5$ integrin), PE 標識 CD49f ($\alpha 6$ integrin), PE 標識 CD51 (αV integrin), PE 標識 Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1), PE 標識 CD62E (E-selectin), PE 標識 Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), PE 標識 Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)(全て Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)。

② 蛋白抽出

第 3 章で作成した LPS 気管内投与によるマウス急性肺傷害モデル (ALI)と *Pseudomonas aeruginosa* 生菌の気管内投与による肺炎モデル (PP)のマウスを、気管内投与から 6 時間後に犠死させ、肺を採取した。一個体につき 50 mg の肺組織に 500 μ l の PBS を加え、ホモジナイザーを用いて細胞破碎液を作成し、これを 15,000 rpm で 30 分遠心した後、上清分画を蛋白検体として回収した。得られた蛋白検体は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)によ

り定量した。いずれの検体も -80°C で冷凍保存し、必要時に解凍してサイトカインの測定に用いた。

③ 急性肺傷害モデル、肺炎モデルにおける肺組織内 E-selectin 濃度の測定

ALI 群、PP 群における肺組織内の E-selectin 発現は、Mouse E-selectin/CD65E DuoSet® ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)を用いマニュアルに従って測定した。肺組織内 E-selectin 濃度の比較に際しては、測定値を検体総蛋白濃度で除した値を補正值として用いた。

④ 細胞浸潤試験

10%FBS 加 RPMI1640 培養液で培養した NL17 細胞株を 0.25% トリプシン EDTA で Dish から剥離し、FBS 無添加 RPMI1640 培養液中に浮遊させた。LPS 無添加、LPS 100ng/ml 添加、LPS 100ng/ml+抗 ICAM-1 中和抗体(40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)添加、LPS 100ng/ml+Isotype IgG 抗体添加の 4 群に分け、各群 1×10^6 個/ml に調整した。各群の細胞浮遊液を、ゼラチンでコーティングした 24 穴 トランスウェルの上室に 1×10^5 個/well で分注し、下室には 10%FBS 加 RPMI1640 培養液をベースに上記 4 群と同様に群分けした培養液を注入した。注入後は 37°C 、5% CO_2 環境下で 12 時間インキュベートを行い、トランスウェルのメンブレンを 100%メ

タノールで固定した後、HE 染色を行った。染色後のメンブレンはスライドガラス上に置き、カバーガラス下に封入し、顕微鏡(BZ-X700, KEYENCE, 大阪、日本)にて観察を行った。無作為に選んだ 200 倍観察(3 視野/各メンブレン)での細胞数を合計して群間の比較を行った。

⑤ LPS 刺激下 NL17 細胞株の肺転移形成能に関する検討 (*in vivo*)

LPS(最終濃度 100ng/ml)で 6 時間刺激した NL17 細胞株と非刺激 NL17 細胞株を各々 5×10^5 個マウス尾静脈に注射し、7 日目に犠死させ肺組織を採取し肺重量を測定した。その後、肺組織は 10%ホルムアルデヒド中で 48 時間固定し、パラフィン包埋を行った。パラフィン包埋標本は肺左葉最大割面で標本を作製し、HE 染色を行った。肺転移形成の比較のため、最大割面における腫瘍面積を Image J を用いて算出した。

⑥ 統計学的解析

得られたデータは JMP Pro 13.1.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC)を用いて解析した。平均値で求められる数値には標準誤差を付記し、2 群間の比較には Welch の t 検定もしくは Mann-Whitney の U 検定を、多群間の比較に関しては one-way ANOVA 及び post-hoc test として Tukey の検定を用いた。いずれの検定においても $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。

第 3 節 結果

(1) LPS 刺激による NL17 細胞株の接着分子の発現

LPS(最終濃度 100ng/ml)刺激後 6 時間目及び 24 時間目における NL17 細胞株上の接着分子の発現について検討した。NL17 細胞株では、LPS 非刺激下において既に $\alpha 5$ integrin、 $\alpha 6$ integrin、 αV integrin、 $\beta 1$ integrin、 $\beta 4$ integrin の発現が認められ、LPS 刺激によってもそれらの発現に変化は認められなかった(図 15A)。一方、 $\alpha 2$ integrin、VCAM-1、ICAM-1 は LPS 刺激で発現が亢進した(図 15B)。

(2) LPS 刺激による NL17 細胞株上の ICAM-1 発現の経時的推移

LPS(最終濃度 100ng/ml)刺激の 1 時間後、3 時間後、6 時間後、9 時間後、12 時間後、24 時間後の NL17 細胞株上の ICAM-1 の発現を検討した。LPS 刺激の 6 時間後に ICAM-1 の発現が最も亢進し、発現細胞の割合は無刺激時と比較して約 2 倍にまで増加した(無刺激 vs. LPS 刺激下：発現陽性細胞 21.1% \pm 1.0 vs. 40.1 \pm 0.4%)。また、LPS 刺激後 3 時間から 24 時間までの間、無刺激の細胞と比較して LPS 刺激下の細胞では有意に ICAM-1 の発現が亢進していた($p < 0.05$)(図 15C)。

(3) LPS 刺激による NL17 細胞株の浸潤能の変化と抗マウス ICAM-1 抗体の浸潤抑制効果に関する検討

トランスウェル浸潤アッセイを用いて、LPS 刺激及び抗マウス ICAM-1 抗体が NL17 細胞株の浸潤能に及ぼす影響について検討した。Control 群に比べ LPS 刺激群及び LPS + Isotype control 抗体添加群では有意に浸潤細胞の増加を認め、LPS + 抗マウス ICAM-1 抗体添加群では LPS + Isotype control 抗体群と比較して有意に浸潤細胞の減少を認めた(Control 群 : 1.00 ± 0.06 , LPS 群 : 1.44 ± 0.07 , LPS + Isotype control 抗体群 : 1.48 ± 0.09 , LPS + 抗マウス ICAM-1 抗体群 : 1.26 ± 0.03 , $p < 0.05$)(図 16)。

(4) LPS 刺激下 NL17 細胞株の肺転移形成

LPS(最終濃度 100ng/ml)で 6 時間刺激した NL17 細胞株をマウス尾静脈から注射し、肺転移形成能について検討した。LPS 群は Control 群と比較して有意に肺重量の増加が認められるとともに(Control 群 : $0.40 \pm 0.01\text{g}$, LPS 群 : $0.44 \pm 0.01\text{g}$, $p < 0.05$)(図 17A)、病理組織標本においても有意に腫瘍面積の増加が認められた(Control 群 : 1.00 ± 0.07 , LPS 群 : 1.25 ± 0.08 , $p < 0.05$, 各群 $n=6$)(図 17B)。

(5) 急性肺傷害モデル及び肺炎モデルでの肺組織中 E-selectin の発現

LPS 気管内投与によるマウス急性肺傷害モデル(ALI)及び *Pseudomonas aeruginosa* 生菌の気管内投与による肺炎モデル(PP)においてモデル作成 6 時間後の肺組織中の E-selectin 濃度を ELISA 法で測定した。ALI 群、PP 群

ともに Sham 群と比較して有意に高い E-selectin 濃度を示した(Sham 群 : 116.2±33.3 pg/mg protein, ALI 群 : 240.4±36.0 pg/mg protein, PP 群 : 270.8±50.2 pg/mg protein, p<0.05, 各群 n=6)(図 18)。

第 4 節 考察

本章ではまず、NL17 癌細胞株における細胞接着分子の発現と LPS 刺激による発現の変化について検討した。その結果、NL17 細胞株上には複数の接着分子の発現が認められたが、LPS 刺激によって $\alpha 2$ integrin, VCAM-1, ICAM-1 の発現の亢進が認められた。また、LPS 刺激により亢進した細胞浸潤能は、抗マウス ICAM-1 抗体投与によって部分的に抑制されたことから、ICAM-1 などの接着分子の発現の亢進が腫瘍の転移形成に関与している可能性が示された。次に、生体外で LPS 刺激を行った NL17 細胞株では、刺激を行わなかった NL17 細胞株と比較して、肺転移形成が促進されることも示された。さらに、ALI, PP では肺組織内の E-selectin 濃度が上昇しており、ALI, PP の両モデルにおける肺転移形成の促進のメカニズムとして、LPS 刺激による腫瘍細胞側と肺の両者の接着分子発現の亢進が関与しているものと考えられた。

ICAM-1 は 75~115kd の糖蛋白で、血管内皮細胞、胸腺上皮細胞や線維芽細胞など様々な細胞に発現を認め、そのリガンドである LFA-1(Lymphocyte

Function Associated Antigen-1)や Mac-1 抗原(Macrophage-1 antigen)を有する白血球などの免疫担当細胞との接着に關与する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子である。ICAM-1 は IL-1, TNF- α , IFN- γ などの炎症性サイトカインによりその発現が增強され、生体への感染性侵襲に対する免疫応答初期での免疫担当細胞の動員に深く關与すると考えられている(42, 44, 45)。さらに近年、腫瘍の転移形成と ICAM-1 発現の關連についての数多くの知見が報告されている。例えば、ICAM-1 はリガンドである LFA-1 や Mac-1 抗原との接着により癌細胞自身で炎症性サイトカインや vascular endothelial growth factor (VEGF)を産生し、好中球や腫瘍關連マクロファージの遊走を促すほか、遊走してきた好中球と接着することで好中球を活性化させ、好中球から放出されるエラスターゼにより血管内皮細胞間隙の開大を引き起こす。また、細胞外基質のアクチオシンの収縮、細胞自体の形状変化などを引き起こすことで、腫瘍細胞の血管内から組織内への浸潤や、前転移ニッチの形成に寄与することが報告されている(46-50)。さらに Greenwood らは、腫瘍細胞上に発現している ICAM-1 を抗 ICAM-1 抗体でブロックすることで ICAM-1 の細胞質内ドメインが失われ、その結果として細胞質内での Rho 蛋白の活性化が抑制され、腫瘍細胞の浸潤能が抑制されると報告している(51)。

以上から、LPS 投与による腫瘍細胞上の接着分子の発現亢進が肺転移形成に

関与している可能性が示唆されたが、本検討の ICAM-1 に関わる結果は、あくまでも *in vitro* での実験に基づくものであり、急性肺傷害や肺炎での肺転移形成と ICAM-1 発現との関連を示すためには、*in vivo* の実験系においても ALI 群、PP 群への抗 ICAM-1 抗体投与や腫瘍細胞の ICAM-1 ノックダウンによる肺転移形成の抑制効果を示す必要がある。また、本検討において LPS 刺激による腫瘍細胞上の VCAM-1 や $\alpha 2$ インテグリンの発現亢進も認められており、これらの細胞接着分子についても腫瘍細胞の転移・進展に関与していることが予想される(49,52)。したがって、感染性侵襲時の細胞接着分子の発現と転移形成の関連については更なる検討が必要だと考えられる。

第 5 節 小括

本章では、第 3 章で示した肺局所での炎症反応が肺転移を促進するメカニズムを腫瘍細胞側及び宿主側の細胞接着分子に着目して検討した。その結果、LPS の刺激により腫瘍細胞上の $\alpha 2$ integrin、ICAM-1、VCAM-1 などの接着分子の発現が亢進し、ALI 群、PP 群での肺組織中 E-selectin の発現が亢進することがわかった。また、LPS 刺激により亢進した腫瘍細胞の細胞浸潤能が抗 ICAM-1 抗体で抑制されたことから、LPS の気管内投与による急性肺傷害モデ

ル(ALI)での肺転移促進のメカニズムとして、これらの細胞接着分子が関与している可能性が考えられた。

第 5 章 総括

本研究では、生体に対する感染性侵襲が癌の進展・転移に及ぼす影響についてマウスにおける腹膜炎併発大腸癌肝転移モデル、急性肺傷害、肺炎併発大腸癌肺転移モデルを用いて実験的検討を行った。

まず、第 2 章では、腹腔内感染による肝転移に与える影響を検討した。また、第 3 章では急性肺傷害及び肺炎が肺腫瘍形成に与える影響について検討した。その結果、どちらの感染性侵襲も癌の進展・転移に関与することが示された。

腹膜炎モデルでは、古くから肝での ICAM-1 等の接着分子の発現が亢進することが示されており、感染性侵襲時の肝転移の形成に、第 4 章で示したような接着分子の関与が報告されている(53)。本研究では感染性侵襲時の腫瘍細胞の転移能獲得の新たな機序として感染性侵襲時に産生される HGF に着目し、腫瘍細胞における HGF と c-Met の相互作用について検討を加えた。その結果、第 2 章で示した腹膜炎モデルにおける肝転移形成に関しては、*in vitro* 及び *in vivo* の両方の結果から HGF/c-Met カスケードの関与が示唆された。

一方、急性肺傷害モデル(ALI)や肺炎モデル(PP)においては、腹膜炎モデル(CLP)における肝転移に見られたような HGF/c-Met の直接的な関与は明らかでなく、むしろ、ICAM-1 や E-selectin などの細胞接着分子が関与している可能

性が考えられた。全身性の炎症を容易に惹起する腹膜炎と、炎症が比較的局所に限局する急性肺傷害や肺炎では生体への侵襲度には大きな差が存在する。われわれの示す結果は、腫瘍細胞の転移形成において、肝臓や肺といった異なる臓器では異なるメカニズムを介して転移が促進されている可能性を示唆するものである(図 19)。

感染性合併症を併発した際、生体内では病原体の排除、炎症反応のコントロール、組織修復など生体の **homeostasis** の維持のために、サイトカイン、接着分子のネットワークが多彩な反応を呈している。侵襲下の悪性腫瘍の増殖・進展のメカニズムを理解するためには、感染性合併症下の生体反応の正確な把握に基づき、それが癌微小環境に与える影響を解明していくことが重要であると考えられた。

第 6 章 結論

本研究ではマウス腹膜炎モデルで肝転移形成が促進され、マウス急性肺傷害、肺炎モデルで肺転移形成が促進されることが示された。そのメカニズムとして腹膜炎モデルにおける肝転移形成には HGF/c-Met カスケードが、急性肺傷害、肺炎モデルには細胞接着分子が関与している可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり御指導を賜りました防衛医科大学校の長谷和生学校長、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校外科学講座の上野秀樹教授に深甚なる感謝の意を表します。また、長きにわたり終始直接御指導、御教示頂きました防衛医科大学校病院医療安全感染対策部の辻本広紀教授、防衛医科大学校分子生体制御学講座の四ノ宮成祥教授に深く感謝致します。御校閲賜りました防衛医科大学校生理学講座の守本祐司教授に感謝致します。また、防衛医科大学校研究センター外傷研究部門の齋藤大蔵教授、宮崎裕美学内講師をはじめ、御協力頂きました防衛医科大学校研究センター外傷研究部門、防衛医科大学校分子生体制御学講座ならびに教室の皆様にご心より感謝致します。

略語一覧（出順）

PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
LPS	Lipopolysaccharide
HGF	Hepatocyte growth factor
IL-10	Interleukin-10
TGF- β	Transforming growth factor- β
IFN- γ	Interferon- γ
IL-12	Interleukin-12
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
IL-18	Interleukin-18
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
CLP	Cecal ligation and puncture
HE 染色	Hematoxylin-Eosin 染色
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
rmHGF	recombinant mouse HGF
c-Met KD	c-Met ノックダウン
MOI	multiplicity of infection : 感染強度

PBS	Phosphate Buffered Saline
PVDF 膜	PolyVinylidene DiFluoride 膜
HRP	Horse Radish Peroxidase (西洋わさびペルオキシダーゼ)
EGFR	epidermal growth factor receptor
ALI	Acute Lung Injury : Lipopolysaccharide の気管内投与による 急性肺傷害モデル
PP	Pseudomonas Pneumonia : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 生菌の 気管内投与による肺炎モデル
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen-1
Mac-1 抗原	Macrophage-1 抗原
VEGF	Vascular endothelial growth factor

参考文献

1. WHO. Leading causes of death by economy income group. [updated 2018 May 24; cited 2018 May 28]. Available from: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Shimada H, Fukagawa T, Haga Y, Oba K. Does postoperative morbidity worsen the oncological outcome after radical surgery for gastrointestinal cancers? A systematic review of the literature. *Ann Gastroenterol Surg.* 2017;1(1):1-23.
3. Tsujimoto H, Ueno H, Hashiguchi Y, Ono S, Ichikura T, Hase K. Postoperative infections are associated with adverse outcome after resection with curative intent for colorectal cancer. *Oncology letters.* 2010;1(1):119-25.
4. Tsujimoto H, Ichikura T, Ono S, Sugawara H, Hiraki S, Sakamoto N, et al. Impact of postoperative infection on long-term survival after potentially curative resection for gastric cancer. *Annals of surgical oncology.* 2009;16(2):311-8.
5. Matsumoto Y, Tsujimoto H, Ono S, Shinomiya N, Miyazaki H, Hiraki S, et al. Abdominal Infection Suppresses the Number and Activity of Intrahepatic Natural Killer Cells and Promotes Tumor Growth in a Murine Liver Metastasis Model. *Ann Surg Oncol.* 2016;23 Suppl 2:257-65.
6. Birgisson H, Wallin U, Holmberg L, Glimelius B. Survival endpoints in colorectal cancer and the effect of second primary other cancer on disease free survival. *BMC Cancer.* 2011;11:438-9.
7. Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta histochemica.* 2010;112(1):3-25.
8. Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock.* 2008;29(3):315-21.
9. Chochi K, Ichikura T, Kinoshita M, Majima T, Shinomiya N, Tsujimoto H, et al. Helicobacter pylori augments growth of gastric cancers via the lipopolysaccharide-toll-like receptor 4 pathway whereas its lipopolysaccharide attenuates antitumor activities of human mononuclear cells. *Clin Cancer Res.* 2008;14(10):2909-17.
10. Tsujimoto H, Ono S, Ichikura T, Matsumoto Y, Yamamoto J, Hase K. Roles

of inflammatory cytokines in the progression of gastric cancer: friends or foes? *Gastric Cancer*. 2010;13(4):212-21.

11. Kawaguchi T. Organ Preference of Cancer Metastasis and Metastasis-Related Cell Adhesion Molecules Including Carbohydrates. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2016;15(3):164-86.
12. Deng JY, Liang H. Clinical significance of lymph node metastasis in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(14):3967-75.
13. Tsujimoto H, Ono S, Mochizuki H, Aosasa S, Majima T, Ueno C, et al. Role of macrophage inflammatory protein 2 in acute lung injury in murine peritonitis. *J Surg Res*. 2002;103(1):61-7.
14. Tsujimoto H, Ono S, Majima T, Kawarabayashi N, Takayama E, Kinoshita M, et al. Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock*. 2005;23(1):39-44.
15. Majima T, Ichikura T, Seki S, Takayama E, Hiraide H, Mochizuki H. Interleukin-10 and interferon-gamma levels within the peritoneal cavity of patients with gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2001;78(2):124-30; discussion 31.
16. De Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Infusino S, Auriemma A, et al. Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Cancer*. 1999;86(10):1936-43.
17. Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, Emi Y, Watanabe A, Akazawa K, et al. Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(2):607-14.
18. Majima T, Ichikura T, Seki S, Takayama E, Matsumoto A, Kawabata T, et al. The influence of interleukin-10 and interleukin-18 on interferon-gamma production by peritoneal exudate cells in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res*. 2002;22(2B):1193-9.
19. Sugawara H, Ichikura T, Kinoshita M, Ono S, Majima T, Tsujimoto H, et al. Gastric cancer cells exploit CD4+ cell-derived CCL5 for their growth and prevention of CD8+ cell-involved tumor elimination. *Int J Cancer*. 2008;122(11):2535-41.
20. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(5):361-71.
21. Majima T, Ichikura T, Chochi K, Kawabata T, Tsujimoto H, Sugawara H, et al. Exploitation of interleukin-18 by gastric cancers for their growth

- and evasion of host immunity. *Int J Cancer*. 2006;118(2):388-95.
22. Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, Kistner E, Kenny H, Becker AR, et al. c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion. *Cancer Res*. 2007;67(4):1670-9.
 23. 堀口 寛之, 辻本 広紀, 高畑 りさ, 平木 修一, 野村 信介, 伊藤 希, 他. 食道癌周術期における血清中 Hepatocyte Growth Factor 値、IL-6 値測定意義の検討. *日本食道学会学術集会プログラム・抄録集*. 2015;69 回:105.
 24. Sekine K, Fujishima S, Aikawa N. Plasma hepatocyte growth factor is increased in early-phase sepsis. *J Infect Chemother*. 2004;10(2):110-4.
 25. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*. 1991;251(4995):802-4.
 26. Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, Gustafson M, Waters DJ, Zhang YW, et al. RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumor cell signaling and survival. *Cancer research*. 2004;64(21):7962-70.
 27. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(12):915-25.
 28. Lee D, Sung ES, Ahn JH, An S, Huh J, You WK. Development of antibody-based c-Met inhibitors for targeted cancer therapy. *ImmunoTargets and therapy*. 2015;4:35-44.
 29. 辻本 広紀, 高畑 りさ, 小野 聡, 平木 修一, 熊野 勲, 松本 佑介, 他. 急性腹症における Hepatocyte Growth Factor(HGF)測定の意義. *Shock: 日本 Shock 学会雑誌*. 2012;27(1):60.
 30. Gao W, Bing X, Li M, Yang Z, Li Y, Chen H. Study of critical role of c-Met and its inhibitor SU11274 in colorectal carcinoma. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2013;30(2):546.
 31. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Matushita K, Fujikawa H, Tanaka K, et al. Co-expression of hepatocyte growth factor and c-Met predicts peritoneal dissemination established by autocrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling in gastric cancer. *International journal of cancer*. 2012;130(12):2912-21.
 32. Thiel A, Ristimaki A. Targeted therapy in gastric cancer. *APMIS*. 2015;123(5):365-72.
 33. Rimassa L, Assenat E, Peck-Radosavljevic M, Pracht M, Zagonel V,

- Mathurin P, et al. Tivantinib for second-line treatment of MET-high, advanced hepatocellular carcinoma (METIV-HCC): a final analysis of a phase 3, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Oncol.* 2018;19(5):682-93.
34. Smith M, De Bono J, Sternberg C, Le Moulec S, Oudard S, De Giorgi U, et al. Phase III Study of Cabozantinib in Previously Treated Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: COMET-1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2016;34(25):3005-13.
35. Takeuchi H, Miyata H, Gotoh M, Kitagawa Y, Baba H, Kimura W, et al. A risk model for esophagectomy using data of 5354 patients included in a Japanese nationwide web-based database. *Annals of surgery.* 2014;260(2):259-66.
36. Tsujimoto H, Takahata R, Nomura S, Kumano I, Matsumoto Y, Yoshida K, et al. Predictive value of pleural and serum interleukin-6 levels for pneumonia and hypo-oxygenations after esophagectomy. *J Surg Res.* 2013;182(2):e61-7.
37. Liu F, Schaphorst KL, Verin AD, Jacobs K, Birukova A, Day RM, et al. Hepatocyte growth factor enhances endothelial cell barrier function and cortical cytoskeletal rearrangement: potential role of glycogen synthase kinase-3beta. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2002;16(9):950-62.
38. Ware LB, Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* 2002;282(5):L924-40.
39. Nayeri F, Brudin L, Darelid J, Nilsson I, Fryden A, Soderstrom C, et al. Hepatocyte growth factor may act as an early therapeutic predictor in pneumonia. *Scandinavian journal of infectious diseases.* 2002;34(7):500-4.
40. Raymond WW, Xu X, Nimishakavi S, Le C, McDonald DM, Caughey GH. Regulation of hepatocyte growth factor in mice with pneumonia by peptidases and trans-alveolar flux. *PloS one.* 2015;10(5):e0125797.
41. Sun Q, Sun F, Wang B, Liu S, Niu W, Liu E, et al. Interleukin-8 promotes cell migration through integrin alphavbeta6 upregulation in colorectal cancer. *Cancer letters.* 2014;354(2):245-53.

42. Rosette C, Roth RB, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, et al. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2005;26(5):943-50.
43. Chang AC, Chen PC, Lin YF, Su CM, Liu JF, Lin TH, et al. Osteoblast-secreted WISP-1 promotes adherence of prostate cancer cells to bone via the VCAM-1/integrin alpha4beta1 system. *Cancer letters*. 2018;426:47-56.
44. Maruo Y, Gochi A, Kaihara A, Shimamura H, Yamada T, Tanaka N, et al. ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer. *International journal of cancer*. 2002;100(4):486-90.
45. Yasuda M, Tanaka Y, Tamura M, Fujii K, Sugaya M, So T, et al. Stimulation of beta1 integrin down-regulates ICAM-1 expression and ICAM-1-dependent adhesion of lung cancer cells through focal adhesion kinase. *Cancer research*. 2001;61(5):2022-30.
46. Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(10):7614-20.
47. Park GS, Kim JH. LPS Up-Regulates ICAM-1 Expression in Breast Cancer Cells by Stimulating a MyD88-BLT2-ERK-Linked Cascade, Which Promotes Adhesion to Monocytes. *Molecules and cells*. 2015;38(9):821-8.
48. Barnett CC, Jr., Moore EE, Mierau GW, Partrick DA, Biffl WL, Elzi DJ, et al. ICAM-1-CD18 interaction mediates neutrophil cytotoxicity through protease release. *The American journal of physiology*. 1998;274(6 Pt 1):C1634-44.
49. Wu QD, Wang JH, Condron C, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *American journal of physiology Cell physiology*. 2001;280(4):C814-22.
50. Bonan S, Albregues J, Grasset E, Kuzet SE, Nottet N, Bourget I, et al. Membrane-bound ICAM-1 contributes to the onset of proinvasive tumor stroma by controlling acto-myosin contractility in carcinoma-associated fibroblasts. *Oncotarget*. 2017;8(1):1304-20.
51. Greenwood J, Amos CL, Walters CE, Couraud PO, Lyck R, Engelhardt B, et al. Intracellular domain of brain endothelial intercellular adhesion

molecule-1 is essential for T lymphocyte-mediated signaling and migration. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2003;171(4):2099-108.

52. Casal JJ, Bartolome RA. RGD cadherins and alpha2beta1 integrin in cancer metastasis: A dangerous liaison. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1869(2):321-32.
53. Hildebrand F, Pape HC, Harwood P, Muller K, Hoevel P, Putz C, et al. Role of adhesion molecule ICAM in the pathogenesis of polymicrobial sepsis. *Exp Toxicol Pathol*. 2005;56(4-5):281-90.

表 1 胃癌の増殖や宿主の抗腫瘍免疫に關与するサイトカイン

Cytokines	Main cellular sources	Mechanisms
Direct activation to progress tumor		
TNF α	Macrophages, dendritic cells, B-cells, NK cells, keratinocytes	Promoting DNA damage, inhibiting DNA repair, and induction of angiogenic factors
IL-1	Macrophages, dendritic cells, B-cells, NK cells, keratinocytes	Enhancing COX-2, iNOS, PGE2, ICAM-1, VCAM-1, and angiogenesis
IL-6	Macrophage, T-cells, B-cells, fibroblast, endothelial cell	Activating JAK/ STAT3 pathway
IL-18	Macrophages	Binding receptor for IL-18 expressed on tumor cells
TGF β	Macrophage, regulatory T-cells	Activating JNK and ERK pathway
Chemokines	Macrophages, T-cells, eosinophils, fibroblast, endothelial cells, platelets	Promoting angiogenesis, and binding chemokine receptors expressed on tumor cells
Suppression of antitumor immunity		
TGF β	Macrophages, regulatory T-cells	Suppression of host antitumor immunity
IL-10	Macrophages, T-cells, B-cells, mast cells	Suppression of host antitumor immunity
Activation of antitumor immunity		
IFN γ	NK cells, NKT cells, T cells	Direct antiproliferative and proapoptotic effects on tumor cells, induction of cell cycle arrest, and activation of NK, NKT, and macrophages
IL-12	Macrophages, dendritic cells, B-cells	Activating NK, NKT cell to produce IFN γ
IL-18	Macrophages	Activating NK, NKT cell to produce IFN γ

Tsujimoto H. Gastric Cancer. 2010; 13(4):212-21 (10)から引用改変

表 2 rmHGF による NL17 細胞株の細胞増殖への影響 (細胞増殖試験)

	0h	24h	48h	p-value
Control	0.24 ± 0.01	0.93 ± 0.03	2.19 ± 0.12	
rmHGF(5ng/ml)	0.23 ± 0.02	0.96 ± 0.03	2.40 ± 0.10	p<0.01
rmHGF(50ng/ml)	0.24 ± 0.01	0.98 ± 0.04	2.49 ± 0.14	p<0.001

mean ± SD

PBS 添加、rmHGF 添加 (5ng/ml, 50ng/ml) による NL17 細胞株の細胞増殖への影響について検討した。表の数値は吸光度を示している。24 時間後では各群間に差を認めなかったが、48 時間後では rmHGF 添加群が PBS 添加群と比較して有意な吸光度の上昇が認められ、rmHGF が細胞増殖を促進することが示された。

p-value は Control 群との比較を行った値(two-way ANOVA and Tukey's test)

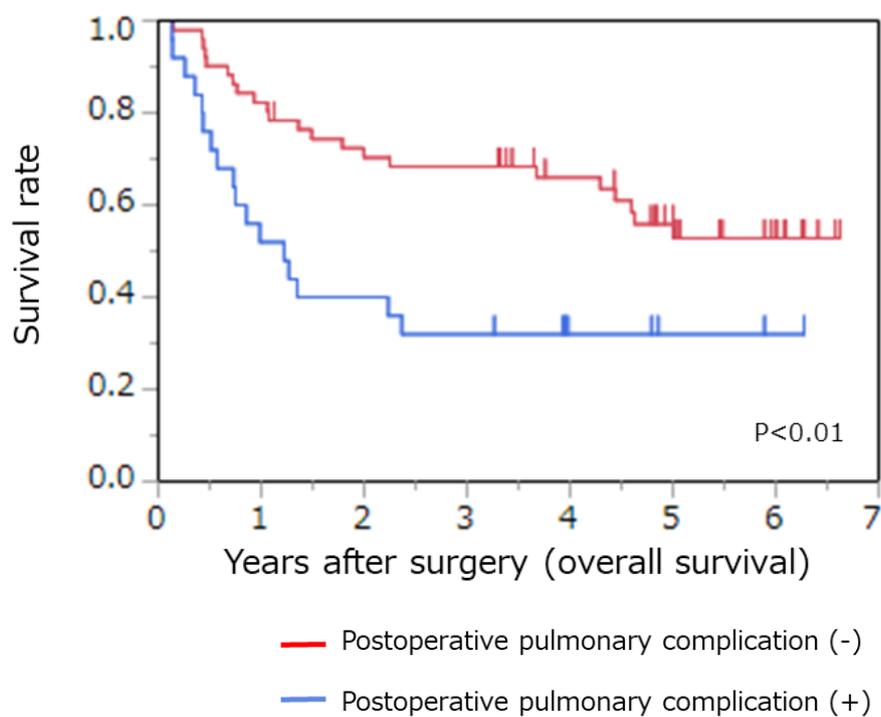
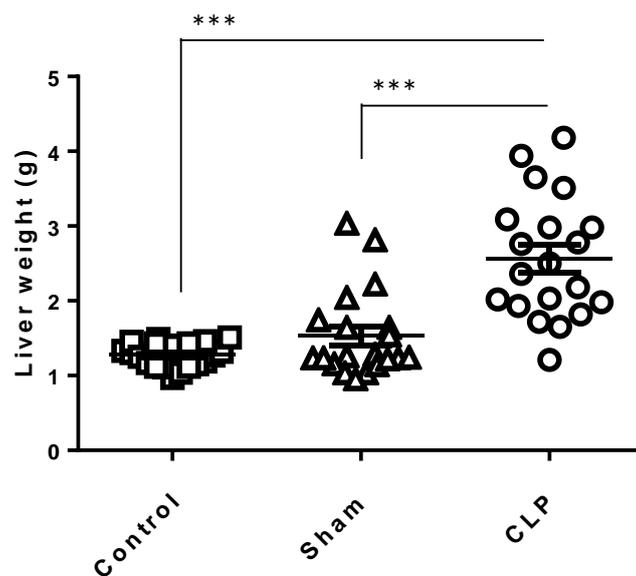


図1 当教室における食道扁平上皮癌患者の術後生存曲線（全生存率）
 2009年3月から2013年8月までに当教室にて手術を行った食道扁平上皮癌患者の術後生存曲線を術後呼吸器合併症の有無で群分けして示す。
 術後呼吸器合併症を発症した群では発症しなかった群と比較して有意に生存率の低下が認められた($p < 0.01$ by Log rank test)。

A



B

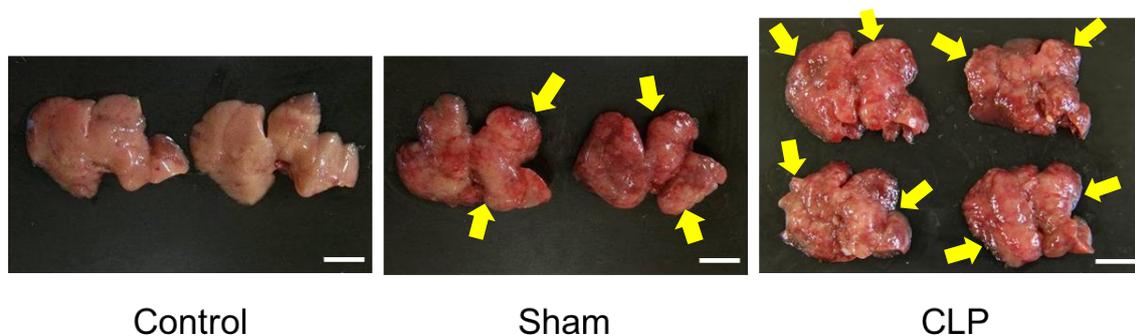


図 2 腹膜炎が肝腫瘍形成に及ぼす影響

A : 1×10^5 個の NL17 細胞株を脾臓に接種後 14 日目の各群 (□ : Control 群、△ : Sham 群、○ : CLP 群) の肝重量を示す。CLP 群は Control 群及び Sham 群と比較して有意な肝重量の増加が認められた。

B : 腫瘍細胞接種後 14 日目の各群の肝臓の肉眼組織写真を示す。肝重量と同様、Control 群及び Sham 群と比較して CLP 群では肝転移形成が促進されていた。

*** $p < 0.001$ by one-way ANOVA and Tukey's test

Scale Bar (白線) : 1cm

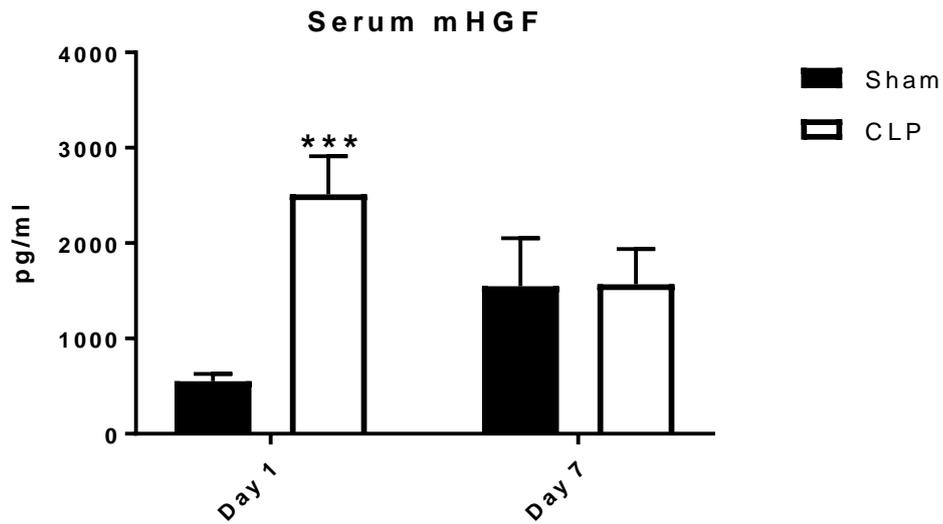


図3 CLP後の血清mHGF値の推移

Sham群及びCLP群における処置後1日目(Day1)、7日目(Day7)の血清mHGF値の推移を示している。mHGF値は1日目においてCLP群で有意に上昇している ($p < 0.001$) が、7日目では群間差を認めなかった。

*** $p < 0.001$ by Welch's t-test

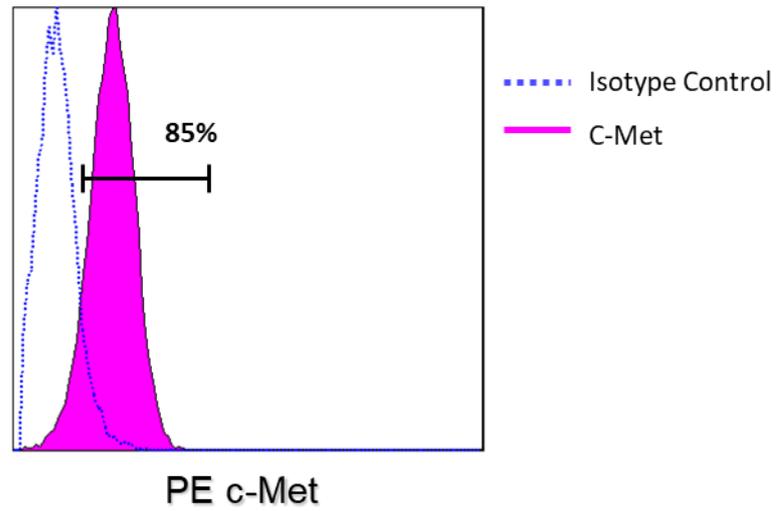


図 4 NL17 細胞株の c-Met 発現

NL17 細胞株における c-Met の発現をフローサイトメトリーで検証した。青点線は Isotype control を、赤色のヒストグラムは細胞表面における c-Met の発現を示す。NL17 細胞株の約 85% に c-Met の発現を認めた。

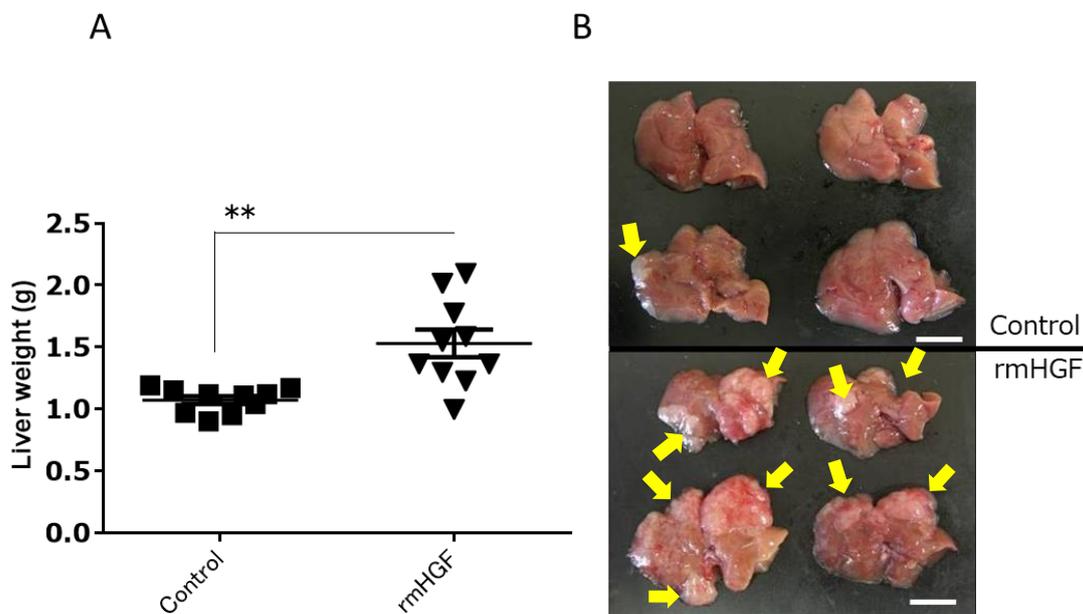


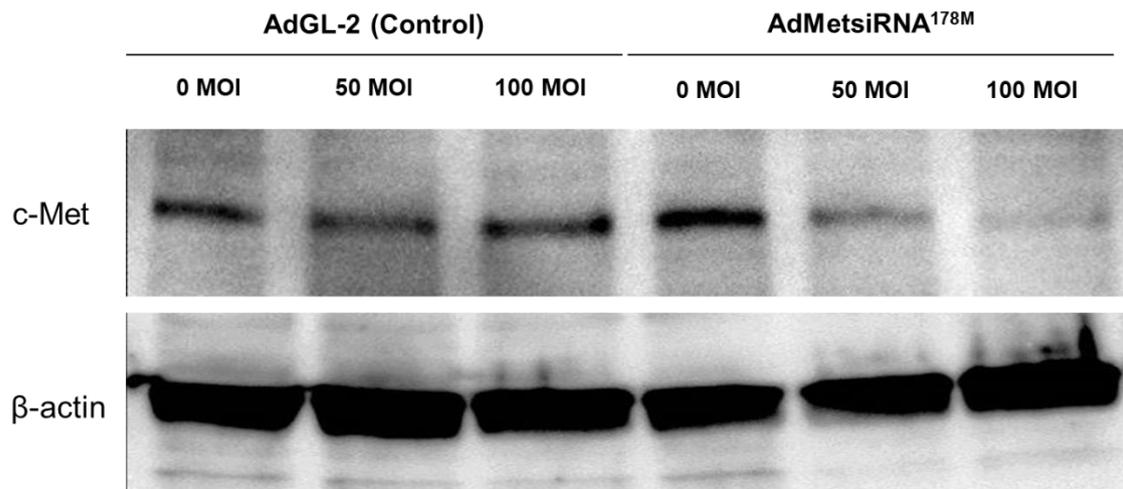
図5 rmHGF 投与による肝転移形成の促進

A : Sham 手術後に腫瘍細胞の脾臓接種を行い、その後 1 日目に rmHGF (2 μ g/個体) の腹腔内投与を行った。14 日目に犠死させ、肝転移形成状況を肝重量にて評価した。rmHGF 投与群 (rmHGF) は生理食塩水投与群 (Control) と比較して、有意に肝重量が増加した。

** $p < 0.01$ by Welch's t-test

B : 腫瘍細胞の脾臓接種後 14 日目の肝臓の肉眼写真を示す。肝重量と同様、rmHGF 投与群は Control 群と比較して肝転移形成が促進していることがわかる。

Scale Bar (白線) : 1cm



MOI : multiplicity of infection

図6 siRNAによるNL17細胞株のc-Metノックダウン

NL17細胞株にc-Metに対するsiRNAを組み込んだアデノウイルス(AdMetsiRNA^{178M})を50 MOI及び100 MOIの割合で感染させた。また、Controlとして非特異的アデノウイルス(AdGL-2)を同様の条件で感染させた。72時間の共培養後に感染細胞から抽出した蛋白検体を用いて、ウエスタンブロット法にてc-Metの発現を確認した。AdMetsiRNA^{178M}に感染させたNL17細胞株は用量依存的にc-Metの発現が抑制された。なお、AdGL-2感染NL17細胞株ではその傾向は認められなかった。

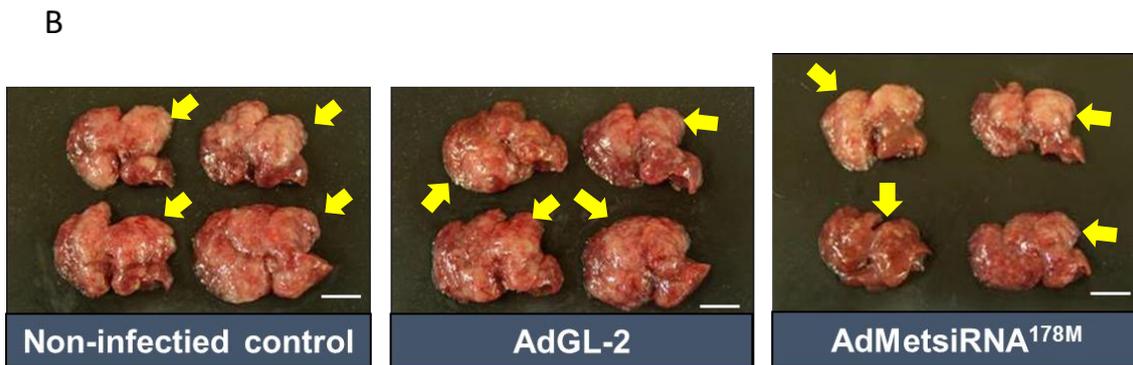
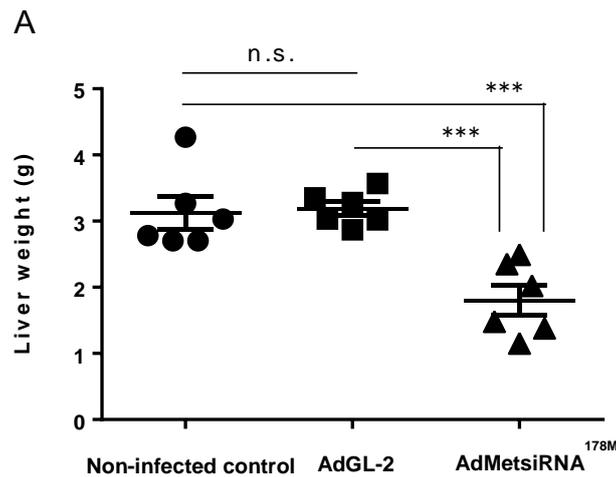


図7 c-Met KD 細胞を用いた CLP 併発担癌マウスにおける肝転移形成状況
 アデノウイルス未感染 NL17 細胞株、AdGL-2 感染 NL17 細胞株、
 AdMetsiRNA^{178M} 感染細胞をそれぞれ脾臓に接種後、腹腔内感染モデルマウス
 を作成し、14 日目における肝重量の測定と肉眼的観察を行った。

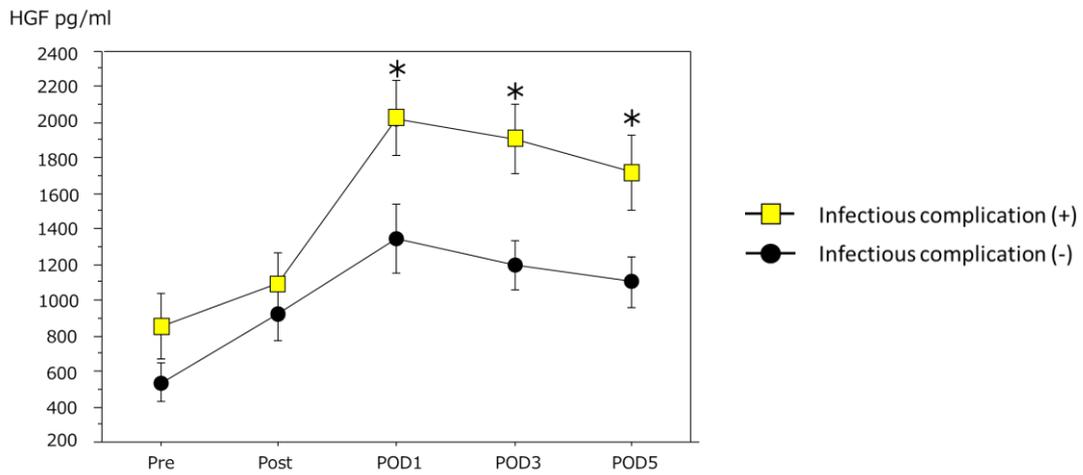
A: 未感染細胞接種群 (Non-infected Control : ●)、AdGL-2 感染細胞接種群
 (AdGL-2 : ■)、AdMetsiRNA^{178M} 感染細胞接種群 (AdMetsiRNA^{178M} : ▲)
 の肝重量を示す。AdMetsiRNA^{178M} 感染細胞群は未感染細胞接種群、AdGL-
 2 感染細胞接種群と比較して、有意に肝重量が低値であった。

*** $p < 0.001$ by one-way ANOVA and Tukey's test

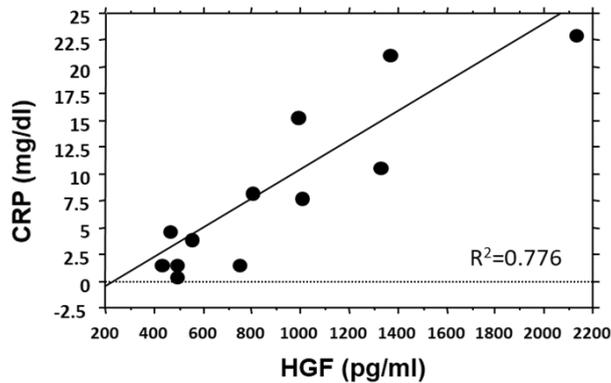
B: 各群の腫瘍細胞接種後 14 日目の肝臓の肉眼組織写真を示す。各群で肝転
 移形成は認められたものの、AdMetsiRNA^{178M} 感染細胞群では未感染細胞接種群
 及び AdGL-2 感染細胞接種群と比較して肝転移形成による肝腫大の傾向は乏
 しかった。

Scale Bar (白線) : 1cm

A



B



A: 堀口寛之ほか 日本食道学会学術集会プログラム・抄録集. 2015; 69回:105. (23)から引用改変

B: 辻本広紀ほか Shock 学会雑誌. 2012; 27(1):60. (29)から引用改変

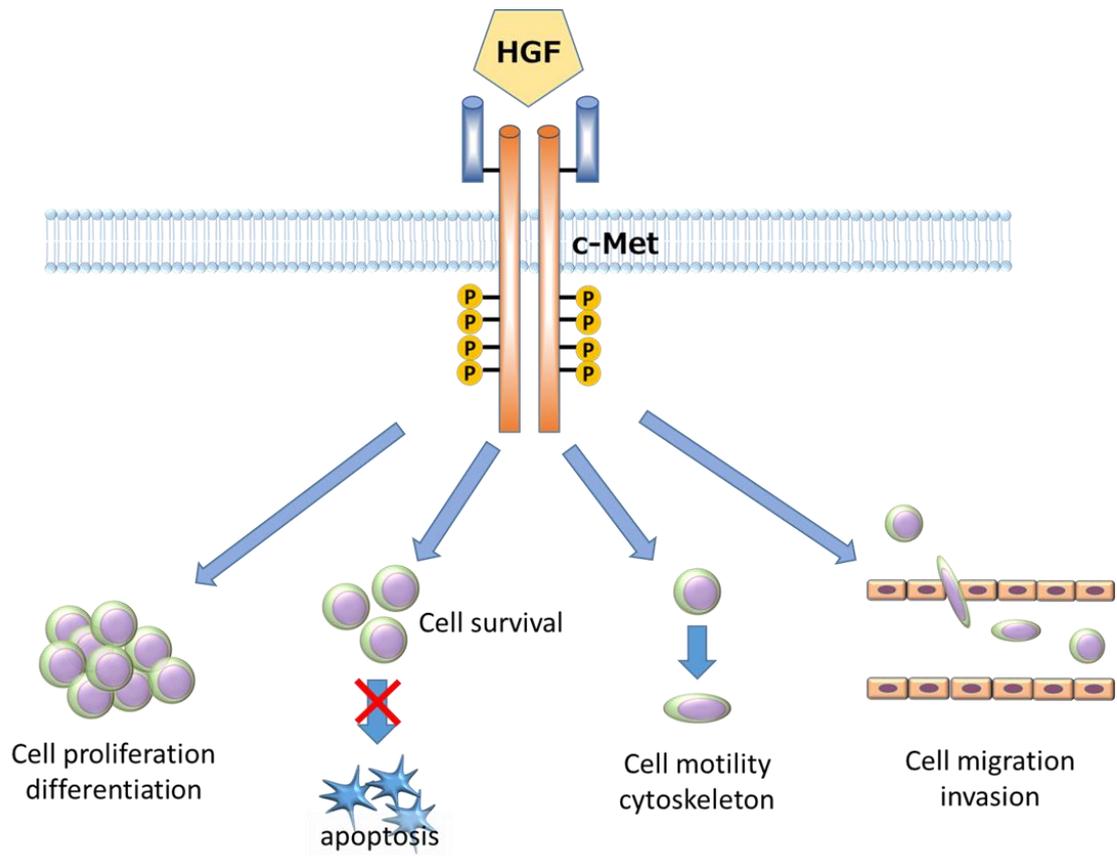
図8 食道癌周術期及び敗血症患者での血清 HGF 値

A: 食道癌周術期の感染性合併症の有無と血清 HGF 値の推移

2009年3月から2013年8月までに当教室にて手術を行った食道扁平上皮癌患者の周術期血清 HGF 値を術後感染性合併症の有無で群分けして示す。術後感染性合併症を発症した群では発症しなかった群と比較して術後1日目から術後5日までの間、有意に HGF 値が高値で推移した。

* p<0.05 by Mann-Whitney U test

B: 敗血症患者における入院時の血清 CRP 値と血清 HGF 値との相関関係
敗血症患者の入院時における血清 HGF 値と CRP 値は正の強い相関を示した($R^2=0.776$)。



Lee, D. Immunotargets Ther. 2015; 9(4):35-44 (28)から引用改変

図9 HGF/c-Met カスケードの細胞機能への主な作用

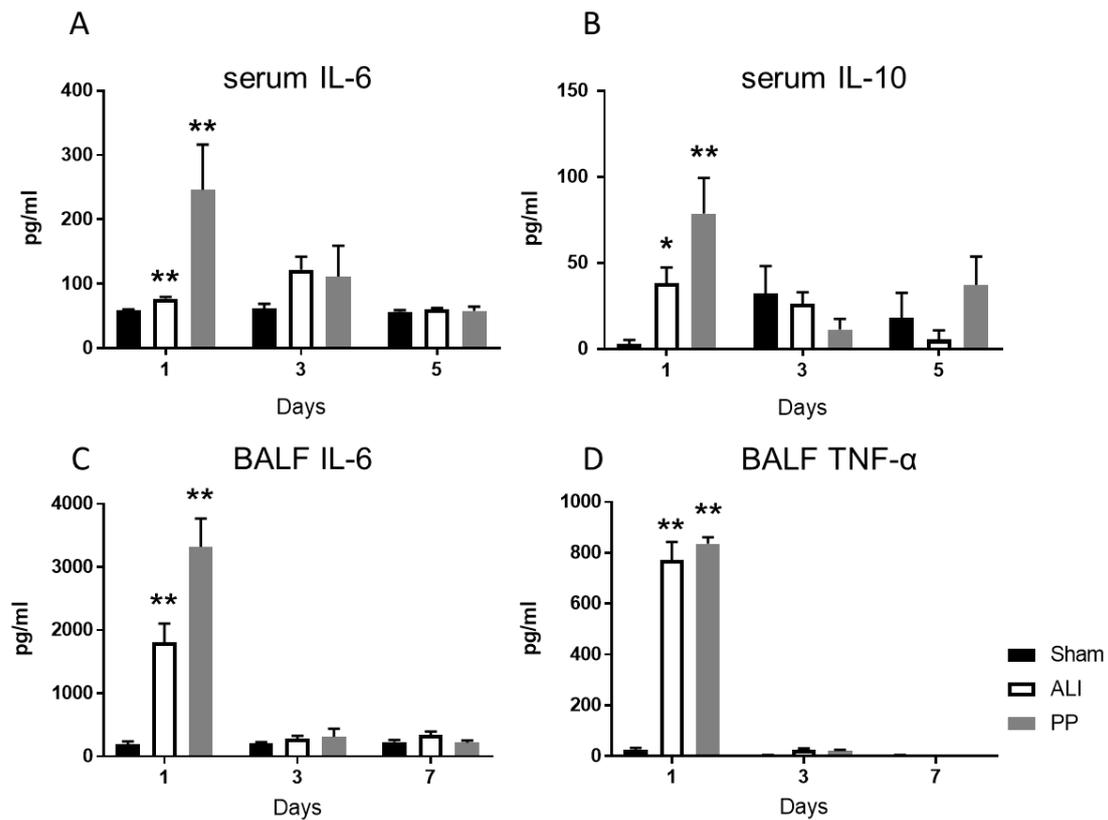


図 10 急性肺障害モデルマウス (ALI)、肺炎モデルマウス (PP) における血清中、肺胞洗浄液中 (BALF) のサイトカインの推移

Sham 群、ALI 群、PP 群での気管内投与後 1 日目 (Day 1)、3 日目 (Day 3)、5 日目 (Day 5) における A : 血清 IL-6 値、B : 血清 IL-10 値、1 日目 (Day 1)、3 日目 (Day 3)、7 日目 (Day 7) における C : 肺胞洗浄液 IL-6 値、D : 肺胞洗浄液 TNF- α 値の推移を示した。ALI 群、PP 群の血清中及び肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- α)、抗炎症性サイトカイン (IL-10) は 1 日目で Sham 群と比較して有意に高値であった。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by one-way ANOVA and Tukey's test (Sham 群との比較)

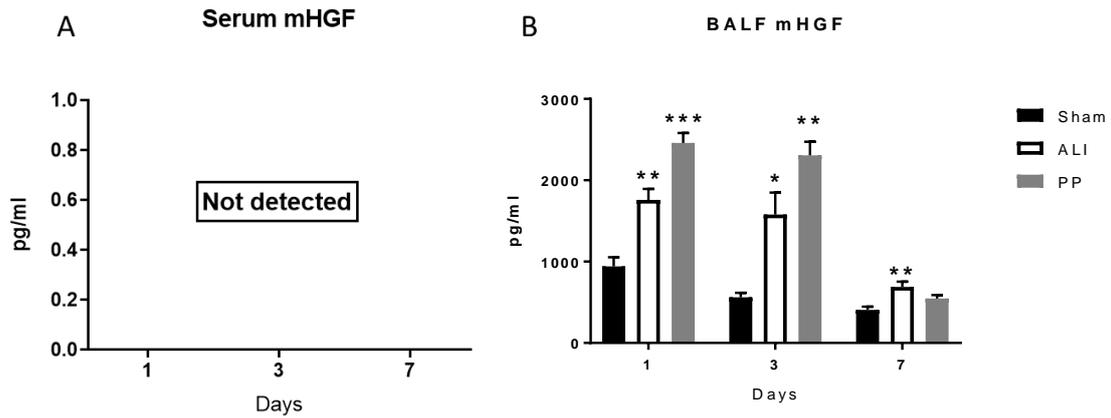


図 11 急性肺障害モデルマウス (ALI)、肺炎モデルマウス (PP) における血清中及び肺胞洗浄液中 (BALF) の mHGF 値の推移

ALI 群、PP 群における LPS, *Pseudomonas aeruginosa* 生菌の気管内投与後 1 日目 (Day 1)、3 日目 (Day 3)、7 日目 (Day 7) における A : 血清中 mHGF 値、B : 肺胞洗浄液中 mHGF 値の推移を示した。血清中では全ての群において mHGF が検出感度以下の値であった。肺胞洗浄液中の mHGF 値は ALI 群では 1 日目から 7 日目まで、PP 群では 3 日目までの間、Sham 群と比較して有意に高値で推移した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** , $p < 0.001$ by one-way ANOVA and Tukey's test (Sham 群との比較)

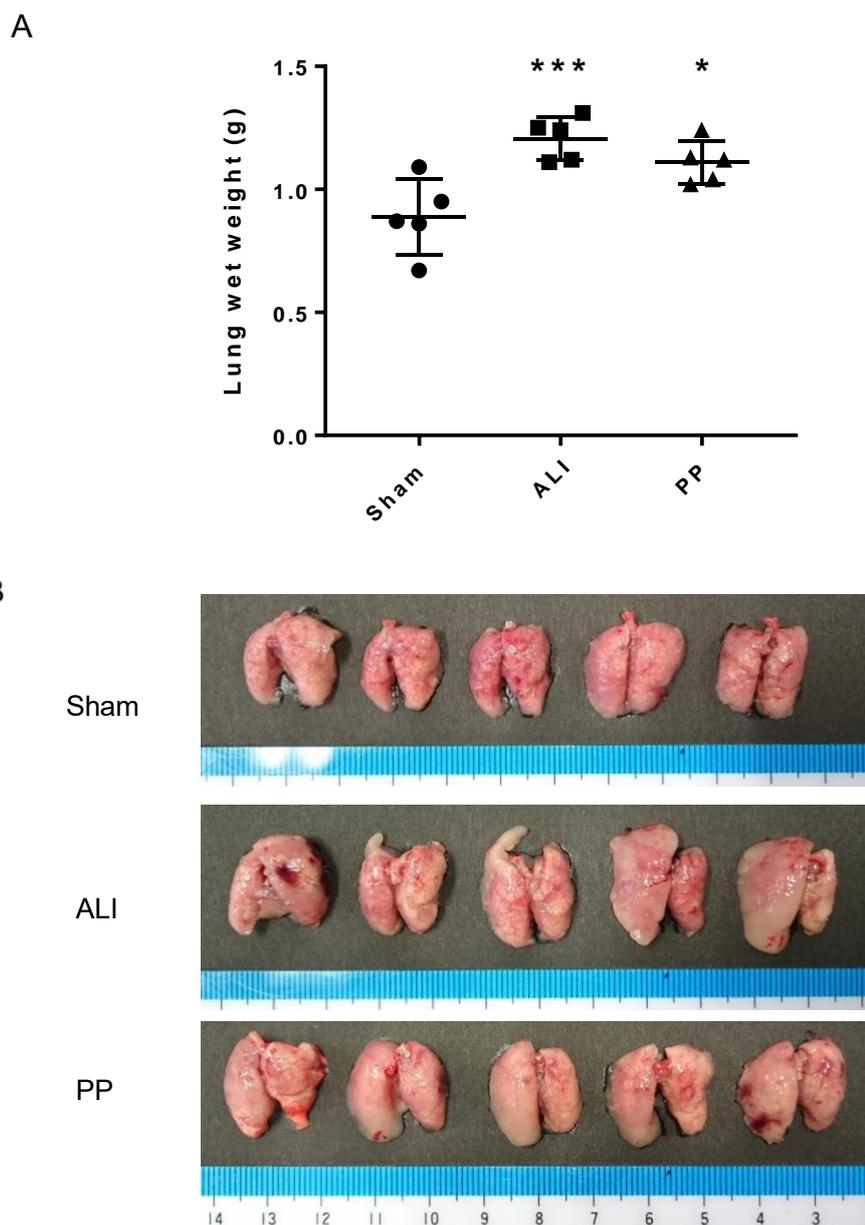


図 12 急性肺障害、肺炎が肺腫瘍形成に及ぼす影響

A : 5×10^5 個の NL17 細胞株を尾静脈から注射した直後に、それぞれ PBS (Sham 群)、LPS (ALI 群)、*Pseudomonas aeruginosa* 生菌 (PP 群) の気管内投与を行った。腫瘍細胞静脈注射後 14 日目の各群の肺重量を示す。ALI 群、PP 群では Sham 群と比較して有意な肺重量の増加が認められた。
* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA and Tukey's test, Sham 群と比較

B : 各群の腫瘍細胞静脈注射後 14 日目の肺の肉眼写真を示す。肉眼的にも肺重量と同様、ALI 群、PP 群では Sham 群と比較して肺腫瘍形成に伴うと考えられる肺の腫大が認められた。

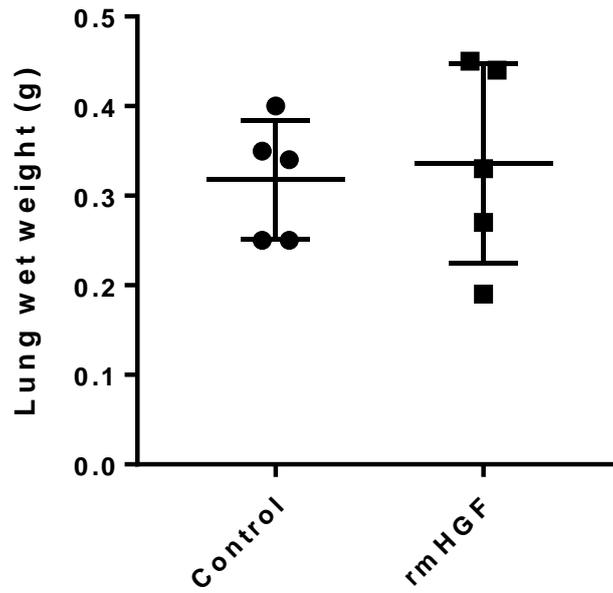


図 13 rmHGF による担癌マウスの肺腫瘍形成への影響

腫瘍細胞の尾静脈注射後 1 日目に rmHGF (5 μ g/個体)の腹腔内投与を行い、10 日目に犠死させ、肺腫瘍形成状況を肺重量にて評価した。なお、Control 群では PBS を腹腔内投与した。両群間で肺重量の差は認められなかった。

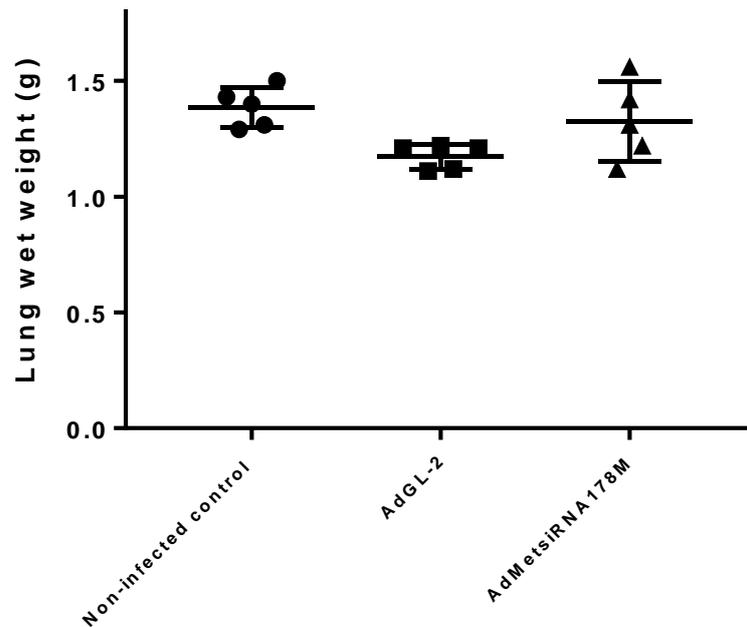
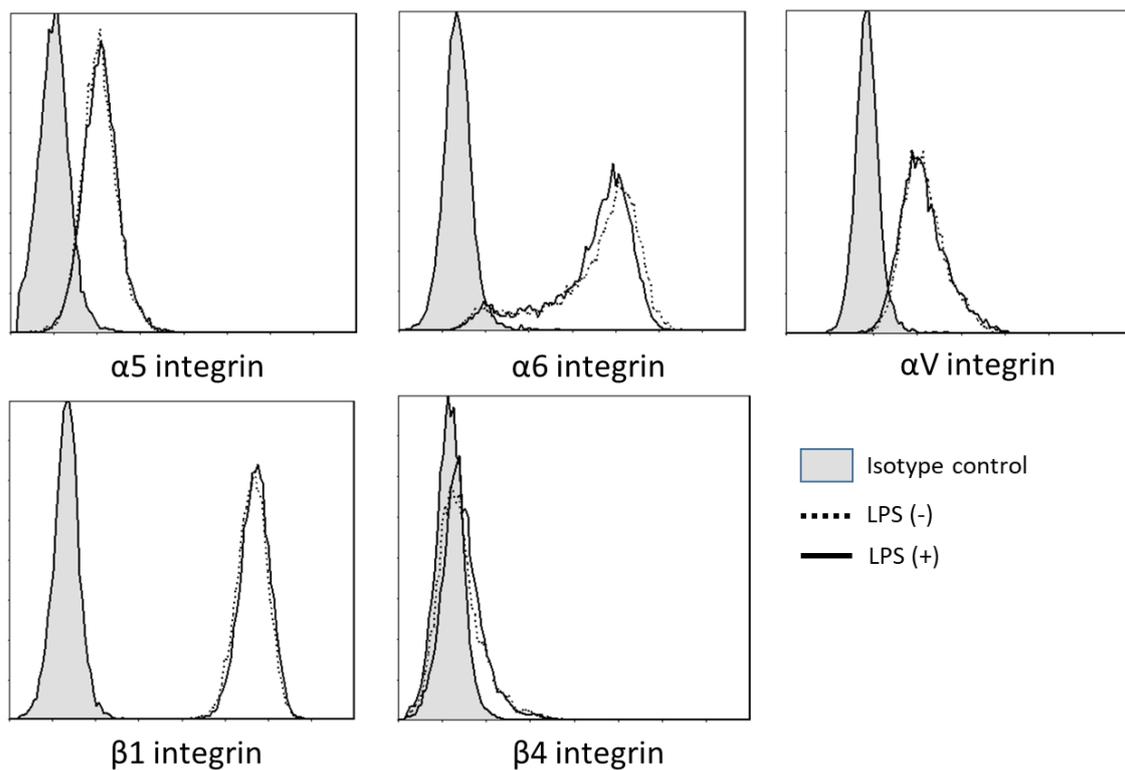


図 14 c-Met KD 細胞を用いた急性肺障害併発担癌マウスにおける肺腫瘍形成状況

アデノウイルス未感染 NL17 細胞株、AdGL-2 感染 NL17 細胞株、AdMetsiRNA^{178M} 感染 NL17 細胞株 (c-Met KD 細胞) をそれぞれ尾静脈から静脈注射後、LPS の気管内投与による急性肺障害モデルマウスを作成し、14 日目における肺重量を測定した。

グラフはアデノウイルス未感染細胞接種群 (Non-infected control : ●)、AdGL-2 感染細胞接種群 (AdGL-2 : ■)、AdMetsiRNA^{178M} 感染細胞接種群 (AdMetsiRNA^{178M} : ▲) の肺重量を示す。各群間において肺重量に差は認められなかった。

A



B

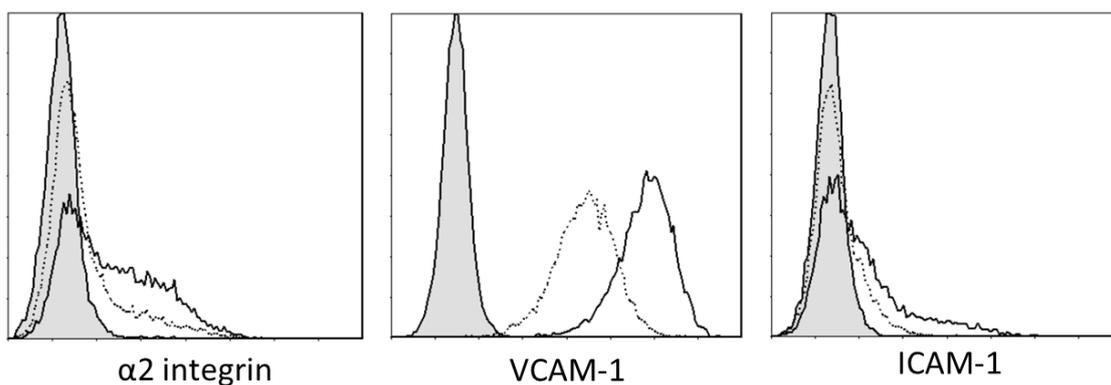


図 15 LPS 刺激による各種接着分子の発現

LPS を 100ng/ml になるように添加した培養液中で 6 時間培養した NL17 細胞株の接着分子発現をフローサイトメトリーにて測定した結果を示す。

α5 integrin, α6 integrin, αV integrin, β1 integrin, β4 integrin については LPS 無添加にてそれぞれ発現が認められるものの、LPS 添加による発現の変化は認められなかった(A)。一方、α2 integrin, VCAM-1, ICAM-1 ではその蛍光強度は LPS の刺激により増強された(B)。

C

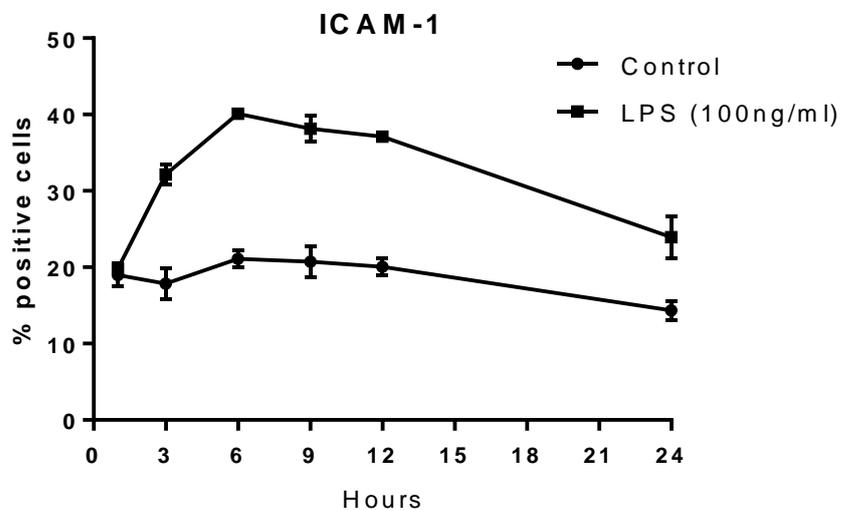


図 15 LPS 刺激による各種接着分子の発現

C : LPS 刺激開始からの経時的な ICAM-1 陽性細胞率の変化について 1 時間後、3 時間後、6 時間後、9 時間後、12 時間後、24 時間後の 6 時点で検討を行った。ICAM-1 は LPS 刺激により、6 時間後をピークとして陽性細胞の割合が増加し、24 時間後においても LPS 刺激無しの細胞と比較して陽性細胞の割合が多かった。

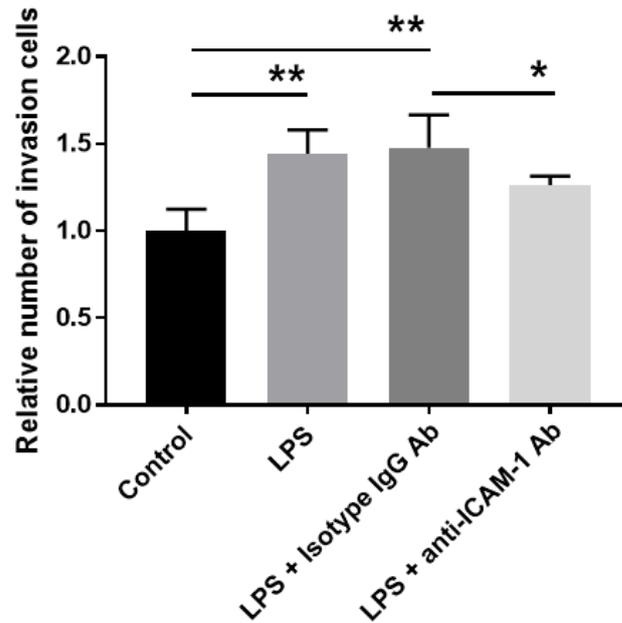


図 16 トランスウェル浸潤アッセイによる LPS 刺激下での NL17 細胞株の浸潤能

LPS 刺激下及び抗マウス ICAM-1 抗体の使用による NL17 細胞株の浸潤能についてトランスウェル浸潤アッセイを用いて検討した。

各群の浸潤細胞数を Control 群を基準として相対的浸潤細胞数を示した。

Control 群に比べ LPS 刺激群(LPS)、LPS + Isotype IgG 抗体添加群(LPS + Isotype IgG Ab)では有意に浸潤細胞の増加を認め、LPS + 抗マウス ICAM-1 抗体添加群(LPS + anti-ICAM-1 Ab)では LPS + Isotype IgG 抗体群と比較して有意に浸潤細胞が減少した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by one-way ANOVA and Tukey's test

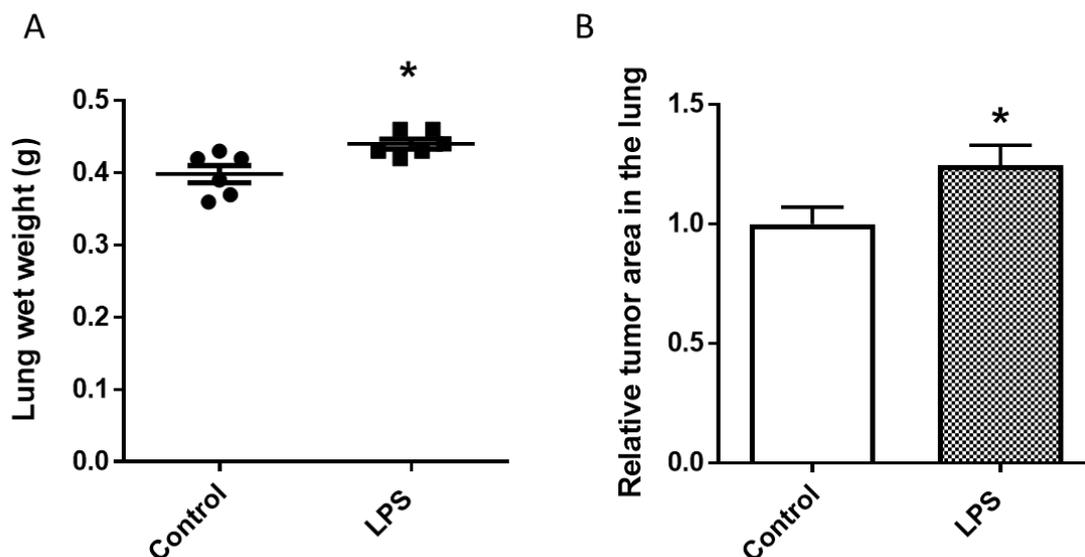


図 17 LPS 刺激による NL17 細胞株の肺腫瘍形成状況

NL17 細胞株を LPS 100ng/ml の濃度で添加した培養液中で 6 時間刺激を行った後に、 5×10^6 個/ml に調整した NL17 細胞株浮遊液を作成し、マウスの尾静脈から 5×10^5 個/100 μ l を注射した。腫瘍細胞注射後 7 日目でマウスを犠死させ、肺を摘出し、肺重量を測定した後、パラフィン包埋標本を作製した。Control 群は LPS で刺激していない細胞を使用した。

A: 各群の肺重量を示す。LPS 群は Control 群と比較して有意に肺重量の増加が認められた。

B: 肺左葉最大断面で作成した標本における腫瘍面積を Control 群を基準として示した。LPS 群では Control 群と比較して有意に腫瘍面積が広がった。

* $p < 0.05$ by Welch t-test

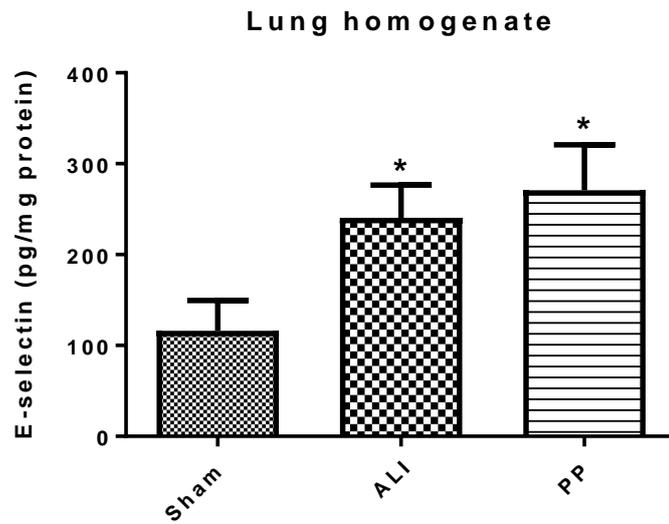


図 18 急性肺障害モデル及び肺炎モデルでの肺組織内 E-selectin の発現
急性肺障害モデルマウス(ALI)、肺炎モデルマウス(PP)での気管内投与 6 時間後における肺内 E-selectin の発現について、各群において肺ホモジネート中の E-selectin 濃度を ELISA 法を用いて測定した。

E-selectin 濃度は測定値を蛋白濃度で除した値を示している。ALI 群、PP 群における肺内 E-selectin 濃度は Sham 群と比較して有意に高値であった。

* $p < 0.05$ by one-way ANOVA and Tukey's test

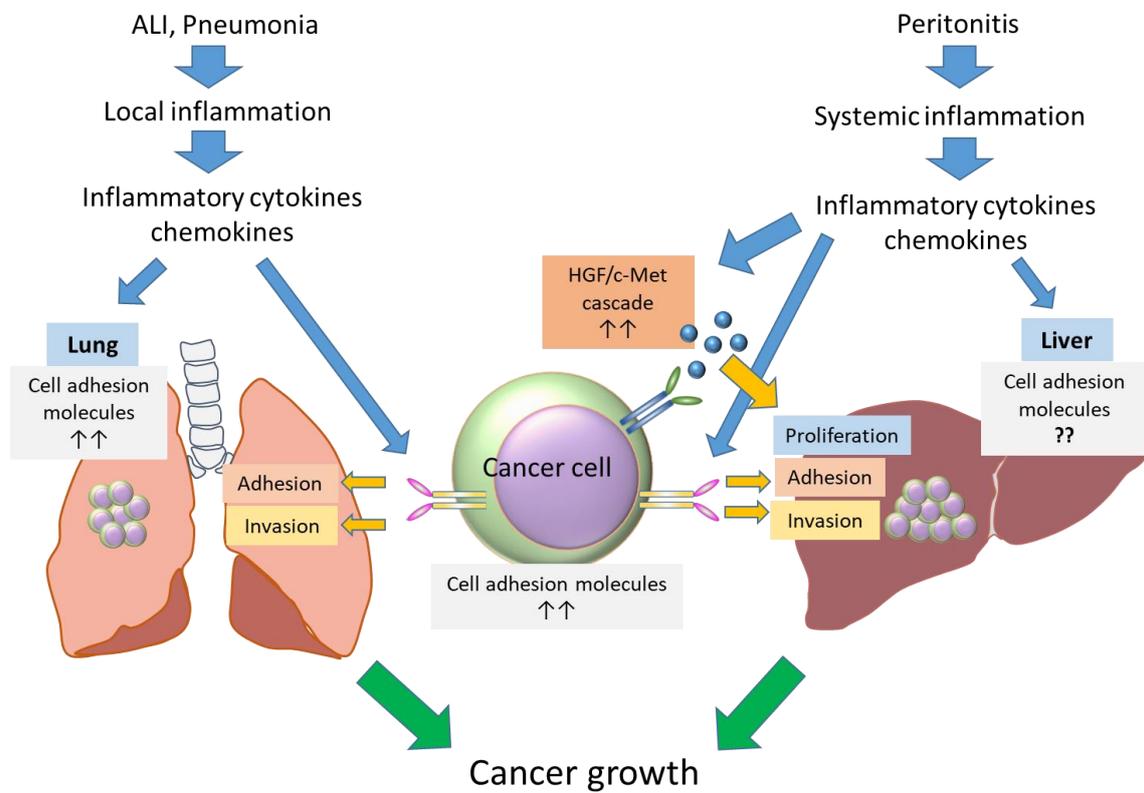


図 19 感染性侵襲に伴う肺及び肝への転移腫瘍形成のメカニズム